ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON DREI UV-SENSIBLEN SACCHAROMYCES - MUTANTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung

der Würde eines Dr. rer. nat.

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von

Dietrich Averbeck

aus Stettin

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0011

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON DREI UV-SENSIBLEN SACCHAROMYCES - MUTANTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung

der Würde eines Dr. rer. nat.

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von

Dietrich Averbeck

aus Stettin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. W. Laskowski
2. Referent: Prof. Dr. H. Nöthel

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 1970
Tag der Promotion: 29. Oktober 1970

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

1.1. Die DNS der Zelle als wichtigster Treffbereich für Strahleneinwirkungen und die Natur UV-induzierter Schädigungen 1

1.2. Reparaturmechanismen, die an der DNS wirksam sind 4

1.2.1. Photoreaktivierung 4
1.2.2. Dunkelreparaturmechanismen 7
1.2.2.1. "Excision-Repair" 7
1.2.2.2. "Post-Replication-Repair" 10

1.3. Strahlensensible Mutanten der Hefe 13

1.3.1. Bisher beschriebene strahlensensible Hefemutanten 13
1.3.2. Biochemischer Nachweis der Dunkelreparatur 15
1.3.3. Wichtige Themenkreise für die Analyse der Strahlensensibilität 17

2. MATERIAL UND METHODIK 18

2.1. Saccharomyces-Stämme 18

2.1.1. Aufbewahrung der Stämme 19

2.2. Medien 19

2.2.1. Vollmedium 19
2.2.2. Synthetisches Minimalmedium 19
2.2.3. Natrium-Lactat-Medium 19
2.2.4. Reines Agar-Medium 20
2.2.5. Präsporulationsmedium n. McCLARY 20
2.2.6. Sporulationsmedium n. McCLARY 20
2.2.7. KH_2PO_4-Puffer 20

Seite

2.3. Vorbereitung der Zellen für die Experimente 20

2.3.1. Anzüchten der Hefestämme 20

2.3.2. Waschen der Zellen und fraktionierte Zentrifugation 21

2.3.3. Bestimmung des Zelltiters 21

2.4. Behandlung mit dem Mutagen 1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin (NNMG) zur Induktion strahlensensibler Mutanten 22

2.5. Sektorenausstrichmethode 22

2.6. Schnelltestverfahren 25

2.7. Strahlenquellen 26

2.8. Bestrahlung und Bestimmung des Koloniebildungsvermögens 27

2.8.1. Zur Darstellung der Versuchsergebnisse 28

2.9. Methoden zur Reaktivierung nach Bestrahlung 28

2.9.1. Dunkelreaktivierung durch Agar-Haltung(AH) 28

2.9.2. Photoreaktivierung 28

2.10. Genetische Analyse 29

2.10.1. Durchführung der Kreuzungen 29

2.10.2. Paarungstypbestimmung 29

2.10.3. Isolierung der Diplonten 30

2.10.4. Sporulation und Tetradenanalyse 30

3. ERGEBNISSE 32

3.1. Induktion und Isolierung strahlensensibler Mutanten 32

3.2. Genetische Analyse 37

Seite

3.2.1. Kreuzungen und Herstellung heterozygoter Diplonten 37

3.2.1.1. Vergleich der r^s-Gene mit den von COX u. PARRY (1968) und RESNICK (1969) identifizierten uvs-Genen 52

3.2.2. Herstellung homozygoter Diplonten ($r^s r^s$) 54

3.3. Charakterisierung der strahlensensiblen Stämme von Saccharomyces 56

3.3.1. Einführung 56

3.3.2. Strahlenempfindlichkeit des Koloniebildungsvermögens der r^s-Stämme 56

3.3.3. Einfluß verschiedener r^s-Gene auf die Strahlensensibilität von Doppelmutanten 60

3.3.4. Reaktivierungsvermögen der r^s-Stämme nach UV-Bestrahlung 63

3.3.4.1. Dunkelreaktivierung durch Agar-Haltung 63

3.3.4.1.1. Fähigkeit zur Reaktivierung während der Agar-Haltung (AHR) bei haploiden r^s-Stämmen 64

3.3.4.1.2. AHR-Vermögen bei homozygoten r^s-Diplonten 69

3.3.4.1.3. Negativer AHR-Effekt 74

3.3.4.1.4. AHR in Abhängigkeit vom Atmungsvermögen der Zellen 75

3.3.4.1.5. Zeitabhängigkeit der AHR 78

3.3.4.2. Photoreaktivierungsvermögen der r^s-Stämme 81

3.3.4.3. Zusammenwirken von PhR und AHR 85

4. DISKUSSION 90

4.1. Genetische Kontrolle der Strahlensensibilität 91

Seite

4.2. Strahlensensibilität der haploiden und homozygoten diploiden r^s-Stämme 97

4.3. Zusammenwirken von r^s-Genen in Doppelmutanten 101

4.4. Agar-Haltungs-Reaktivierung in r^s-Stämmen 103

4.5. Dunkelreparatursysteme bei anderen Saccharomyces-Mutanten 107

4.6. Fähigkeit zur Auslösung UV-induzierter Mutationen 108

4.7. Sporulationsvermögen der homozygoten Diplonten ($r^s r^s$) 110

4.8. Zusammenfassende Charakterisierung der r^s-Mutationen und Vergleich mit uvr^- und rec^-Mutationen bei Bakterien 111

5. ZUSAMMENFASSUNG 115

6. LITERATURVERZEICHNIS 120

1. EINLEITUNG

Seit der Isolierung der ersten strahlensensiblen Mutante Escherichia coli B_{s-1} durch Ruth F. HILL (1958) haben sich die Vorstellungen entscheidend gewandelt, die das Überleben oder Absterben von Zellen nach Bestrahlung mit nichtionisierenden oder ionisierenden Strahlen zu erklären suchen. Hatte man bis dahin allgemein angenommen, daß strahleninduzierte Schädigungen im genetischen Material (der DNS) einer Zelle nach der Bestrahlung unverändert erhalten bleiben und entweder zur Produktion nur mutierter Tochterzellen oder zum Absterben (Zelltod) der Zellen führen müssen, ist heute bekannt, daß die meisten lebenden Organismen genetisch gesteuerte enzymatische Reparaturmechanismen besitzen, die gesetzte Strahlenschäden teilweise oder vollständig beseitigen oder überbrücken können und auf diese Weise das Überleben der Zellen durch Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit des genetischen Materials sichern können.

1.1. Die DNS der Zelle als wichtigster Treffbereich für Strahleneinwirkungen und die Natur UV-induzierter Schädigungen

Die Natur der strahleninduzierten Schädigungen und die für das Überleben notwendigen Reparaturmechanismen wurden bisher am besten bekannt durch Untersuchungen an Prokaryonten (Bakterien) und deren strahlensensiblen Mutanten, wobei als Strahlenquellen vornehmlich ultraviolettes Licht (UV) und Röntgenstrahlen (Rö) benutzt wurden. (Übersichten finden sich bei HANAWALT u. HAYNES, 1967 a u. b; RUPERT u. HARM, 1966; HANAWALT, 1968; HAYNES et al., 1968; HOWARD-FLANDERS, 1968; WITKIN, 1969 a).

Als wesentlich stellten sich dabei die Befunde heraus, die den Nachweis dafür erbrachten, daß die DNS der Zelle den Hauptangriffspunkt für die Strahleneinwirkungen darstellt und nicht das Cytoplasma. (Zusammenfassende Darstellung bei HAYNES, 1964).

Nachdem schon GATES (1928), HOLLAENDER u. CLAUS (1936) und HOLLAENDER u. EMMONS (1941) herausgefunden hatten, daß bei Verwendung von UV-Licht die Aktionsspektren für die Inaktivierung und Mutationsauslösung bei Bakterien und Pilzen mit dem Absorptionsspektrum der Nukleinsäuren übereinstimmen, gelang es GREER u. ZAMENHOF (1957) nachzuweisen, daß durch Inkorporation von Basenanalogen (5-Bromuracil) in die DNS von E. coli die Empfindlichkeit gegen UV-Bestrahlung wesentlich gesteigert wird, d.h., daß durch die Bestrahlung im wesentlichen die DNS der Zelle betroffen ist.

Ähnlich stellten SZYBALSKI u. LORKIEWICZ (1962) in Transformationsversuchen mit der DNS von Bacillus subtilis fest, daß die durch Inkorporation von 5-Bromuracil gesteigerte Röntgenstrahlenempfindlichkeit der Zellen parallel anwächst mit einer entsprechenden Sensibilitätserhöhung der extrahierten DNS. Keine solche Sensibilisierung wurde jedoch in E. coli-Zellen beobachtet, die in Gegenwart von 5-Fluoruracil, das nur in die RNS, aber nicht in die DNS der Zelle eingebaut wird, aufgewachsen waren (KAPLAN, SMITH u. TOMLIN 1961, 1962).

Anhaltspunkte dafür, welche photochemischen Veränderungen in der DNS durch UV-Licht hervorgerufen werden, brachten in vitro-Versuche von BEUKERS u. BERENDS (1960), die nach UV-Bestrahlung von gefrorenen Thyminlösungen Thymin-Dimere nachweisen konnten. Kurz darauf wurden Thymin-Dimere auch in der isolierten DNS UV-bestrahlter Bakterien (Enterococcen) gefunden (WACKER, DELLWEG u. WEINBLUM, 1960). Diese Ergebnisse führten zu dem Schluß, "daß die mutagene und letale Wirkung des UV-Lichtes auf die Zelle überwiegend, wenn nicht ausschließlich, ihre Ursache in der strahlenchemischen Umwandlung des Thymins in der DNS hat." (WACKER, DELLWEG u. WEINBLUM, 1960).

Diese Befunde bestätigten R.B. SETLOW und J.K. SETLOW (1962); sie fanden heraus, daß die in der DNS von Haemophilus in-

fluenzae nach UV-Bestrahlung vorliegenden Thymin-Dimere zum großen Teil für die biologische Inaktivierung verantwortlich sind (SETLOW u. SETLOW, 1962).

Obwohl tatsächlich die UV-induzierten biologischen Schäden in Bakterienzellen weitgehend auf die Bildung von Dimeren aus benachbarten Thyminbasen in der DNS zurückgeführt werden können, entstehen jedoch nach UV-Bestrahlung, insbesondere bei höheren Dosen und verschiedenen Wellenlängen, einige weitere Photoprodukte: Dimere des Cytosins (ĈĈ) und Mischdimere aus Thymin und Cytosin (T̂C) oder durch Desaminierung des Cytosins Dimere des Uracils (Û̂U) und Mischdimere (T̂U), Hydratationsprodukte des Uracils und des Cytosins, Strangbrüche (meist Einzelstrangbrüche), intra- und intermolekulare Vernetzungen (cross-linking) der DNS und Vernetzungen zwischen der DNS und Protein (DELLWEG u. WACKER, 1962 und SMITH, 1966).

SETLOW u. BOLING (1965) konnten zeigen, daß diese letzteren induzierten Schäden von biologischer Relevanz sein können, obwohl sie vermutlich in viel geringerem Ausmaß als TT entstehen. Sie wiesen nach, daß Zellen von Micrococcus radiodurans, dessen außerordentliche Strahlenresistenz gegen UV wahrscheinlich auf ein sehr wirksames Reparatursystem für Thymindimere zurückgeführt werden kann, vermutlich hauptsächlich durch Bildung von Vernetzungen zwischen DNS und Protein inaktiviert werden (SETLOW u. BOLING, 1965).

Den Hauptanteil der UV-Schädigungen stellen jedoch die Pyrimidin-Dimere dar, die z.B. in UV-bestrahlter E. coli DNS in vivo etwa in folgender Verteilung gefunden werden: 50 % T̂T, 40 % ĈT und 10 % ĈC. Wie Versuche in vitro gezeigt haben, hemmen Pyrimidin-Dimere die DNS-Synthese und blockieren die Transformationsaktivität der DNS (SETLOW, SWENSON u. CARRIER, 1963; SETLOW u. CARRIER, 1966). Außer für den größten Teil der letalen Schäden sind die Pyrimidin-Dimere auch für die meisten UV-induzierten mutagenen Schäden verantwortlich (WITKIN, 1966 a u. b und 1969 a). Für die Mutationsauslösung können auch andere photochemische Verände-

rungen (z.B. verursacht durch UV-Licht anderer Wellenlängen 2200 oder 2900 Å) eine ähnliche Rolle spielen (eine umfassende Darstellung über die Mutationsauslösung und das UV-Aktionsspektrum findet sich bei GIESE, 1968). Schätzungen bei E. coli ergaben, daß bei einer UV-Bestrahlungsdosis von 1 erg/mm^2 von Licht der Wellenlänge 2537 Å (Hauptanteil der Strahlung einer Quecksilber-Niederdrucklampe) pro DNS-Molekül mit der Länge von etwa 10^7 Nukleotidpaaren etwa 6 Pyrimidin-Dimere gebildet werden (10^7 Nukleotidpaare entsprechen etwa der Zahl der Nukleotide im E. coli-Genom) (HOWARD-FLANDERS, 1968).

Für das Überleben von Zellen nach Einwirkung von ultravioletten Strahlen ist es demnach von größter Wichtigkeit, ob die gesetzten DNS-Schäden (Pyrimidin-Dimere) repariert oder bei der Replikation toleriert werden können, wobei unter dem Überleben der Zelle die Erhaltung der Teilungsfähigkeit zu verstehen ist.

1.2. Reparaturmechanismen, die an der DNS wirksam sind

Aufgrund von Arbeiten bei Bakterien, insbesondere bei E. coli, sind in den letzten Jahren im wesentlichen drei verschiedene, unabhängig voneinander arbeitende Reparaturmechanismen bekannt geworden:

a) Die Photoreaktivierung
b) Excision-Repair
c) Post-Replication-Repair

Die Photoreaktivierung ist ein lichtabhängiger Prozeß (eine Zusammenfassung der molekularen Grundlagen findet sich bei SCHUSTER, 1969) im Gegensatz zu den anderen Mechanismen, die ohne Mitwirkung von Licht im Dunklen ablaufen können und daher auch als Dunkelreparaturprozesse bezeichnet werden.

1.2.1. Photoreaktivierung

Die Erscheinung der Photoreaktivierung wurde von KELNER (1949)

erstmals bei UV-bestrahlten Konidien von Streptomyces griseus beobachtet und beschrieben. KELNER stellte fest, daß die Überlebensfähigkeit UV-bestrahlter Zellen wesentlich erhöht werden kann, wenn die Zellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht behandelt werden (KELNER, 1949).

Die enzymatische Natur des zugrundeliegenden Prozesses wurde vor allem durch in vitro Versuche geklärt. RUPERT, GOODGAL u. HERRIOTT gelang es in vitro, UV-inaktivierte Transformations-DNS aus Haemophilus influenzae mit Hilfe eines Extraktes aus E. coli-Zellen mit sichtbarem Licht zu reaktivieren (RUPERT, GOODGAL u. HERRIOTT, 1958). WULFF u. RUPERT wiesen nach, daß durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm gebildete Dimere in bestrahlter DNS durch Nachbehandlung mit einem Enzym-Rohextrakt der Hefe und Licht der Wellenlänge 370 nm etwa 90 % der Dimere zum Verschwinden gebracht werden können (WULFF u. RUPERT, 1962). Erst in neuerer Zeit konnte COOK den Beweis dafür bringen, daß die in UV-bestrahlter, radioaktiv markierter E. coli DNS enthaltenen Thymin-Dimere durch ein 6000fach gereinigtes Photoreaktivierungsenzym (isoliert von MUHAMMED, 1966) unter Mitwirkung von längerwelligem UV-Licht direkt in zwei Monomere gespalten werden (COOK, 1967). Obwohl inzwischen das Photoreaktivierungsenzym aus der Hefe (und auch aus E. coli) über tausendfach gereinigt vorliegt, konnte allerdings bisher noch keine Komponente identifiziert werden, deren Absorptionsspektrum dem UV-Aktionsspektrum für die Photoreaktivierung ähnelt (SETLOW, 1966 a u. b).

Wie man heute weiß, besteht der Prozeß der Photoreaktivierung darin, daß sich das Photoreaktivierungsenzym im Dunklen z.B. an UV-bestrahlte Transformations-DNS ansetzt und einen verhältnismäßig stabilen Enzym-Substrat-Komplex bildet, der erst nach Licht-Absorption (UV-Licht über 3000 Å) in seine Bestandteile dissoziiert, wobei gleichzeitig die Aktivität der DNS durch Monomerisierung der Pyrimidin-Dimere in situ wiederhergestellt wird (RUPERT, 1962 a u. b; SETLOW, 1966). Die für das Ansetzen des Enzyms notwendige Region der DNS umfaßt dabei etwa 9 Nukleotide (SETLOW u. BOLLUM,

1968). SETLOW u. BOLING (1963) konnten zeigen, daß die Wirksamkeit der Photoreaktivierung von Transformations-DNS von der Wellenlänge des eingestrahlten Photoreaktivierungslichtes abhängt. Durch Behandlung mit Licht der Wellenlänge 3341 Å wird nur 60 % des Photoreaktivierungswertes bei 4047 Å erreicht. Diese in vitro zu beobachtende enzymatische Photoreaktivierung führt in vivo zur Wiederherstellung des Koloniebildungsvermögens in UV-bestrahlten Zellen (RUPERT, 1965).

Ob allerdings eine Photoreaktivierung UV-bestrahlter Zellen auf die Wirkung eines spezifischen Photoreaktivierungsenzyms zurückgeht, muß von Fall zu Fall entschieden werden. So wiesen JAGGER u. STAFFORD (1965) in einer phr$^-$Mutante von E. coli (unfähig zu enzymatischer Photoreaktivierung, isoliert von HARM u. HILLEBRANDT (1962)) die Existenz einer nicht-enzymatischen, sog. indirekten Photoreaktivierung durch Behandlung UV-bestrahlter Zellen mit Licht der Wellenlänge 3341 Å nach. Wahrscheinlich wirkt in diesem Fall das eingestrahlte Licht ähnlich wie bei der Photoprotektion (JAGGER, 1960; JAGGER, WISE u. STAFFORD, 1964) auf völlig andere Weise reaktivierend: es löst eine Verzögerung des Wachstums aus, wodurch die Zeit zwischen UV-Bestrahlung und dem Beginn der DNS-Replikation verlängert wird, so daß für intrazelluläre Dunkelreparaturprozesse mehr Zeit zur Verfügung steht (z.B. "Liquid-Holding-Recovery", ALPER u. GILLIES, 1960).

Kürzlich hat RESNICK (1969 c) eine phr$^-$Mutante bei Hefen isoliert, die wahrscheinlich kein Photoreaktivierungsenzym besitzt. Es ist bisher nicht bekannt, ob sich in dieser Mutante indirekte Photoreaktivierung nachweisen läßt. Das Vorkommen von indirekter Photoreaktivierung würde eine Analyse der in Hefen zu beobachtenden Überlebensratenerhöhung unter PhR-Bedingungen wesentlich erschweren. Bei der Untersuchung einer UV-sensiblen phr$^-$Mutante (mit der Bezeichnung upr-1) von Neurospora crassa haben sich Hinweise auf eine indirekte Photoreaktivierung ergeben (SCHROEDER, 1968).

1.2.2. Dunkelreparaturmechanismen

1.2.2.1. "Excision-Repair"

Auf diese Art der Reparatur wurde man durch strahlensensible Mutanten von E. coli aufmerksam. Ruth F. HILL gelang es 1958, aus E. coli B die erste extrem UV-empfindliche Mutante E. coli B_{s-1} zu isolieren, die sich als 50 bis 100 mal UV-empfindlicher und etwa 3 bis 5 mal empfindlicher gegen Röntgenstrahlen als der Elternstamm E. coli B erwies.

Erste Hinweise dafür, daß die Strahlensensibilität von E. coli B_{s-1} auf den Verlust eines im Wildstamm ungestört arbeitenden enzymatischen Reparatursystems für UV-induzierte DNS-Schäden zurückgeführt werden kann, ergaben sich aus Versuchen mit UV-bestrahlten T_1 und T_3-Phagen, die in weit geringerem Maße überlebensfähig waren, wenn sie mit Zellen der Mutante E. coli B_{s-1} ausgeplattet wurden, als mit Zellen des strahlenresistenten Elternstammes E. coli B. Man benannte die im Elternstamm vorhandene Fähigkeit zur Reaktivierung UV-bestrahlter Bakteriophagen Wirtszellreaktivierung (engl. "host cell reactivation") (ELLISON, FEINER u. HILL, 1960). In der Folgezeit wurden noch viele weitere Mutanten mit fehlender (negativer) Wirtszellreaktivierung (sog. hcr^-Mutanten) u.a. von HOWARD-FLANDERS, BOYCE, SIMSON u. THERIOT (1962), VAN DE PUTTE, VAN SLUIS (1965) und HOWARD-FLANDERS, THERIOT (1966 a) aus E. coli K 12 isoliert. Durch genetische Konjugationsexperimente konnte gezeigt werden, daß mindestens drei verschiedene Gene in einen strahlensensiblen E. coli-Stamm überführt werden können, die dort Strahlenresistenz verursachen. Die verantwortlichen Gene wurden charakterisiert und kartiert (Zusammenfassung s. ADLER, 1966), und man stellte fest, daß eine Mutation in einem der Loci uvr A, uvr B oder uvr C den Verlust der Reaktivierungsfähigkeit bewirken kann (HOWARD-FLANDERS u. BOYCE, 1965). Interessanterweise liegen die uvr-Gene weit über das Bakteriengenom verteilt und nicht dicht zusammen wie häufig Gene, die einen bestimmten

Syntheseweg kontrollieren. Von historischer Bedeutung ist die Mutante E. coli B_{s-1}, die eine wesentliche Rolle bei der Aufklärung der "Excision-Repair" spielte. SETLOW u. CARRIER (1964) sowie BOYCE u. HOWARD-FLANDERS (1964 a) konnten zeigen, daß während der Inkubation UV-bestrahlter Bakterien Thymin-Dimere aus der DNS des strahlenresistenten Wildtypstammes herausgelöst werden, dagegen aber in der DNS des UV-sensiblen Stammes B_{s-1} unverändert erhalten bleiben.

Nach den heutigen Modellvorstellungen verläuft die Entfernung der Schäden aus der UV-bestrahlten DNS durch "Excision-Repair" (vgl. "cut and patch" oder "patch and cut"-Modelle, beschrieben bei HANAWALT u. HAYNES, 1967 a u.b und HOWARD-FLANDERS u. BOYCE, 1966) folgendermaßen: Durch eine Endonuklease wird als erstes neben der Schadenstelle der DNS-Strang aufgebrochen (eingeschnitten), anschließend wird die Stranglücke durch eine Exonuklease erweitert und das UV-induzierte Dimer zusammen mit einigen benachbarten Nukleotiden herausgeschnitten ("Excision"). Darauf wird durch eine Polymerase die Lücke im DNS-Strang durch Neusynthese des ausgeschnittenen DNS-Stückes wieder geschlossen unter Benutzung des komplementären DNS-Stranges als Matrize (sog. "repair synthesis" oder "repair replication", KETTIJOHN u. HANAWALT, 1964 und BILLEN, HEWITT, LAPTHISOPHON u. ACHEY, 1967). Eine Ligase ("joining enzyme") verbindet in einem folgenden Schritt die alte und neue DNS zu einem kontinuierlichen DNS-Strang. Kürzlich wurden Enzyme mit den Eigenschaften einer Ligase isoliert (WEISS u. RICHARDSON, 1967; GEFTER, BECKER u. HURWITZ, 1967 und OLIVERA u. LEHMANN, 1967).

Da strahlensensible Mutanten wie E. coli B_{s-1} oder E. coli K 12 uvr A, die kein Excision-Repair mehr ausführen können, gleichzeitig empfindlich gegen Einwirkung von Stickstofflost ("nitrogen mustard", HAYNES, 1964; LAWLEY u. BROOKES, 1965; BRIDGES u. MUNSON, 1966), 4-Nitro-chinolin (MORIMYO, SHIMAZU u. SUZUKI, 1969), salpetriger Säure (HOWARD-FLANDERS

u. BOYCE, 1966), Mitomycin C (BOYCE u. HOWARD-FLANDERS, 1964 b; MORIMYO, SHIMAZU u. SUZUKI, 1969) und 1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin (NNMG) (CERDA-OLMEDO u. HANAWALT, 1967) sind, wird allgemein angenommen, daß die Excision-Repair-Enzyme nicht nur spezifisch UV-induzierte Pyrimidin-Dimere, sondern auch andere strukturelle Schäden in der DNS beseitigen können, die durch die genannten Agentien hervorgerufen werden.

MATTERN, ZWENK u. RÖRSCH (1966) konnten inzwischen nachweisen, daß die historisch so bedeutsame Mutante E. coli B_{s-1} eine Doppelmutante darstellt. Sie trägt eine Mutation im uvr B-Locus (gekoppelt an den gal-Locus), die für die Unfähigkeit zum Excision Repair verantwortlich ist, und eine zweite Mutation im exr-Locus, gekoppelt an den mal B-Locus (wahrscheinlich identisch mit dem von HOWARD-FLANDERS u. BOYCE (1966) identifizierten lex-Locus bei E. coli K 12), die eine erhöhte DNS-Degradation nach Rö- und nach UV-Bestrahlung verursacht. Auf diese zweite Mutation ist offensichtlich die Röntgensensibilität von E. coli B_{s-1} (uvr B exr$^-$) und E. coli B_{s-2} (uvr A exr$^-$) zurückzuführen.

Eine genetische Kontrolle der Excision-Reparatur ist aber nicht nur für die uvr-Gene bei E. coli nachgewiesen, sondern auch für bestimmte Loci bei T_2- und T_4-Phagen. Nach RUPERT u. HARM (1966) und HARM (1968) kontrollieren bei T_2- und T_4-Phagen die v oder x-Gene die Excision Reparatur.

Bei E. coli wurde kürzlich von OGAWA, SHIMADA, TOMIZOWA (1968) eine neuartige Gruppe von Mutanten gefunden, die im uvr D-Locus eine Veränderung zeigen, der wahrscheinlich einen wichtigen Schritt bei der sog. "repair-synthesis" kontrolliert. Die Mutanten sind geringer UV-empfindlich, aber wesentlich Rö-empfindlicher als die uvr A, B oder C Mutanten.

Wie GANESAN u. SMITH (1968 u. 1969) herausfanden, spielt ein intaktes Excision-Repair-System eine entscheidende

Rolle für den allgemein als Liquid-Holding-Recovery (LHR) bezeichneten Erholungsprozeß, der zu einer wesentlichen Erhöhung der Überlebensrate UV-bestrahlter Zellen (E. coli) führen kann, wenn die Zellen nach Bestrahlung eine Zeit lang in Puffer ohne Nährstoffzusätze aufbewahrt werden, bevor sie auf Nährmedium gebracht werden. In uvr A Mutanten kann dieser Erholungsprozeß (LHR) nicht ablaufen (GANESAN u. SMITH, 1968 u. 1969). RUPERT u. HARM (1966) nehmen an, daß die LHR auf der Fähigkeit der Zellen beruht, während der Dauer der Pufferhaltung, in der keine DNS-Replikation stattfinden kann, die UV-induzierten Pyrimidin-Dimere mit Hilfe des Excision-Repair-Systems auszuschneiden. Durch den verzögerten Beginn der Replikation steht für die Arbeit der Excision-Enzyme mehr Zeit zur Verfügung, so daß sich die Zahl der Überlebenden wesentlich erhöht.

1.2.2.2. Post-Replication-Repair

Erst vor kurzem ist die Existenz eines zweiten Dunkelreparaturprozesses nachgewiesen worden, der aber nicht primäre Bestrahlungsprodukte in der DNS beseitigt, sondern der vor allem sekundär durch unzureichende Excision-Reparatur von Pyrimidin-Dimeren in replizierender DNS entstehende Einzelstranglücken ("gaps") repariert.

Bei der Untersuchung der Replikation im excision-repair-defekten Stamm E. coli K 12 uvr A 6 fanden RUPP u. HOWARD-FLANDERS (1968), daß nach einer UV-Bestrahlungsdosis von 45 erg/mm^2 (wodurch etwa 270 induzierte Dimeren pro Genom erzeugt werden) die bestrahlten Zellen ungefähr doppelt so lange Zeit zur Replikation der DNS wie unbestrahlte Zellen benötigen, was durch Aufnahme von Tritium-markiertem Thymidin bestimmt werden konnte. Sedimentationsanalysen im Alkali-Sucrose-Gradienten zeigten, daß die während der ersten DNS-Replikation nach Bestrahlung gebildeten Tochterstränge uneinheitlich sind. Aus dem geringeren Molekulargewicht der Tochterstränge, verglichen mit dem Molekulargewicht unbestrahlter elterlicher DNS-Stränge, wurde ge-

schlossen, daß jedem Pyrimidin-Dimer im Matrizenstrang eine Stranglücke im neusynthetisierten Tochter-Strang gegenüberliegt. Während weiterer Inkubation der bestrahlten Zellen erhöhte sich nach und nach die Sedimentationsrate der synthetisierten DNS und näherte sich schließlich dem Wert von normaler DNS.

Diese beobachtete Erhöhung des Molekulargewichts der DNS, die nach UV-Bestrahlung in den excision-repair-defekten Zellen synthetisiert wird, ist nach RUPP u. HOWARD-FLANDERS (1968 u. 1969) auf einen Reparaturmechanismus zurückzuführen, der nach Art eines genetischen Rekombinationsprozesses durch Austausch zwischen neusynthetisierten Schwestersträngen die funktionsfähige Einheit der DNS wiederherstellen kann (HOWARD-FLANDERS, 1968). Nach diesem Modell können die Pyrimidin-Dimere in den ursprünglichen DNS-Strängen erhalten bleiben, während die neusynthetisierten DNS-Bruchstücke durch einen Rekombinationsvorgang neue einheitliche Stränge bilden.

Daß ein direkter Zusammenhang zwischen einem Rekombinationsmechanismus, der unabhängig vom Excision-Reparaturmechanismus arbeitet, und dem Überleben von bestrahlten Zellen besteht, ist zuerst von CLARK u. MARGULIES (1965) gezeigt worden. Es stellte sich heraus, daß die aus E. coli K 12 isolierten, stark strahlensensiblen Mutanten nicht mehr imstande sind, mit geeigneten Partnerstämmen Rekombinanten zu bilden, weshalb die Mutanten auch als rec$^-$ Mutanten bezeichnet werden (CLARK u. MARGULIES, 1965).

Kürzlich wiesen SMITH u. GANESAN (1969) in einem uvr A Stamm von E. coli K 12, der gleichzeitig auch die rec$^-$Mutation trägt, durch Sedimentationsanalyse an der nach UV-Bestrahlung gebildeten DNS nach, daß diesem uvr A rec$^-$ Stamm offensichtlich die Fähigkeit zum Post-Replication-Repair fehlt. Die Reparatur von UV-induzierten Schäden in der DNS bei Stämmen mit einem defekten Excision-repair-System wird durch das noch ungestört vorhandene rec-System ermöglicht.

Bei der Isolierung strahlensensibler Mutanten von E. coli K 12, die sich durch besonders starke Röntgensensibilität auszeichnen, stellte sich heraus, daß das Merkmal fur starke Röntgensensibilität meistens in Verbindung mit der rec⁻Eigenschaft auftritt (HOWARD-FLANDERS, THERIOT, 1966). Viele andere rec⁻Mutanten wurden daraufhin von HOWARD-FLANDERS, BOYCE (1966), VAN DE PUTTE, ZWENK, RÖRSCH (1966), DENHARDT, DRESSLER, HATHAWAY (1967), CLARK (1967) und von EMMERSON (1968) isoliert und die zugrundeliegenden Gene rec A, rec B und rec C charakterisiert und kartiert. Das rec A Gen kontrolliert nicht nur die Röntgenempfindlichkeit, sondern auch die Sensibilität gegenüber Methylmethan-sulfonat, einem Agens, das vorwiegend Einzelstrangbrüche in der DNS hervorruft (HOWARD-FLANDERS u. BOYCE, 1966).

In einer Übersicht zeigt HOWARD-FLANDERS (HOWARD-FLANDERS, 1968, Tab. 1, S. 184), daß sowohl eine Mutation im rec A Locus als auch eine Mutation im uvr A Locus das Überleben von Zellen nach UV-Bestrahlung erheblich reduzieren kann. Die UV-Dosis, die zu 37 % Überlebenden führt (die sog. letale Dosis 37, LD_{37}), erzeugt beim Wildtyp etwa 3200 Pyrimidin-Dimere pro Genom, bei rec A oder uvr A Stämmen jedoch nur etwa 20 bzw. 50 Dimere pro Genom. Für eine Abtötung auf nur noch 37 % Überlebende genügt bei den Doppelmutanten des Typs uvr A rec A schon die Bildung von 1-2 Dimeren pro Genom.

Daraus geht hervor, daß das rec Gen-Produkt in unmutiertem Zustand einen Bakterien-Stamm, unabhängig davon ob dieser gleichzeitig excision-defekt ist oder nicht, dazu befähigt, die Anwesenheit einiger unausgeschnittener Dimere bei der Replikation der DNS zu tolerieren.

Bemerkenswert ist die Eigenschaft der rec⁻Mutanten, spontan während des normalen Wachstums oder nach UV-Bestrahlung ihre DNS zu degradieren, was wahrscheinlich auf die Wirkung von Exonukleasen zurückzuführen ist. Diese Ei-

genschaft gleicht der der exr-Mutanten (z.B. E. coli B_{s-1}) und der lex-Mutanten von E. coli K 12 (HOWARD-FLANDERS u. BOYCE, 1966). Beide Mutanten zeigen ebenfalls reduzierte Rekombinationsfähigkeit und reduzierte UV-Resistenz sowie erhöhte Empfindlichkeit gegen Einwirkung von Rö-Strahlen und NNMG (WITKIN, 1967). Neben der Fähigkeit zur Rekombination ist bei den Mutanten, die in einem der 4 Loci exr, rec A, rec B oder rec C mutiert sind, gleichzeitig die Fähigkeit zur phänotypischen Realisierung anderer UV-induzierter Mutationen in hohem Maße betroffen (WITKIN, 1969 a u. b).

1.3. Strahlensensible Mutanten bei Hefen

1.3.1. Bisher beschriebene strahlensensible Hefemutanten

Nach den umfassenden Arbeiten bei Prokaryonten ist es von großem Interesse, mit Hilfe strahlensensibler Mutanten die evt. vorhandenen Reparatursysteme bei Eukaryonten zu untersuchen. Als einfacher, eukaryontischer Organismus erwies sich die einzellige Hefe Saccharomyces als besonders geeignetes Objekt. Die Hefe bietet die Möglichkeit zum Aufbau genetisch definierter, weitestgehend isogener und homozygoter, haploider und höherploider Stämme (LASKOWSKI, 1962), und sie besitzt echte Chromosomen (von TAMAKI (1965) sind cytologisch 18, nach RESNICK (1969) sind 17 Chromosomen durch genetische Experimente nachgewiesen).

Inzwischen sind bei der haploiden Hefe eine Anzahl UV- und Rö-empfindlicher Mutanten isoliert und beschrieben worden (NAKAI u. MATSUMOTO, 1967; SNOW, 1967; COX u. PARRY, 1968; LASKOWSKI et al., 1968; LASKOWSKI u. AVERBECK, 1968; MOUSTACCHI, 1969; RESNICK, 1969; ZAKHAROV et al., 1970). Analog zu den Befunden bei Bakterien konnte die Strahlensensibilität auf Mutationen einzelner definierter Gene zurückgeführt werden. Insgesamt sind schon mehr als 22 Gene bekannt geworden, die die Strahlensensibilität gegenüber ultravioletten Strahlen kontrollieren.

Die haploiden Mutanten mit extremer UV-Sensibilität UV_1^s und UV_2^s (NAKAI u. MATSUMOTO, 1967), uvr 9 und uvr 4 (SNOW, 1967), uvs 2, uvs 6 und uvs 13 (COX u. PARRY, 1968), uvs_z (MOUSTACCHI, 1969), uvs 1, uvs 9-2 und uvs 9-3 (RESNICK, 1969) und uvs 1 (ZAKHAROV et al.,1970) zeigen dabei durchschnittlich einen Dosisreduktionswert von etwa 20-30, gemessen bei 10^{-2} Überlebenden.

Von einer ausgeprägt Rö-sensiblen Hefemutante mit einem Dosisreduktionsfaktor von 2,0 berichteten erstmals NAKAI u. MATSUMOTO (1967). Die Eigenschaften der isolierten Mutante X_1^s erinnern an die der rec⁻Mutanten von E. coli K 12. Bei den rec⁻ Mutanten wurde neben der Röntgensensibilität auch eine gewisse UV-Sensibilität nachgewiesen; gleichzeitige Anwesenheit von rec⁻ und uvr A in einer Doppelmutante führt zu einer wesentlichen Erhöhung der schon in uvr A Mutanten beobachteten UV-Empfindlichkeit. Analog zu diesen Befunden vermag die X_1^s-Mutation der Hefe erheblich die UV-Empfindlichkeit zu erhöhen, wenn sie zusammen mit der UV_1^s-Mutation oder UV_2^s-Mutation vorliegt. In ähnlicher Weise wirkt sich offenbar auch das x-Gen bei T_4-Phagen aus, das als Doppelmutation zusammen mit dem v-Gen die UV-Empfindlichkeit der Phagen wesentlich steigert (RUPERT u. HARM, 1966).

Vier von RESNICK isolierte röntgensensible Mutanten xs 1, xs 2-1, xs 2-2 und xs 3 scheinen ebenfalls eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber UV zu besitzen (Dosisreduktionsfaktoren etwas größer als 1,0). Zwei der für die Röntgensensibilität verantwortlichen Mutationen xs 1 und xs 3 spielen offensichtlich bei der Meiose eine Rolle, ihre Gegenwart in homozygoten Diplonten verhindert die Bildung von Askosporen.

Zwischen der Röntgenempfindlichkeit und der Unfähigkeit zur Rekombination scheint ähnlich wie bei den rec⁻Mutanten von E. coli K 12 (HOWARD-FLANDERS u. BOYCE, 1966) auch bei einigen Hefemutanten ein gewisser Zusammenhang zu bestehen. Nach einem Bericht von MORTIMER konnte RODARTE bei 18 iso-

lierten Mutanten der Hefe, die die normale Fähigkeit zur Rekombination verloren haben, für vier Mutanten gleichzeitig eine Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen nachweisen (VON BORSTEL, 1969; RODARTE, FOGEL u. MORTIMER, 1968). Demgegenüber hat SNOW (1968) an UV-sensiblen homozygoten uvs-Stämmen keine Erhöhung der spontanen mitotischen oder meiotischen Rekombination im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Allerdings wurden gewisse Unterschiede für die Häufigkeit der intergenischen meiotischen Rekombination in den homozygoten Stämmen beobachtet (SNOW, 1968).

Die Wirkung von uvs-Allelen hinsichtlich der Fähigkeit zu meiotischer intergenischer Rekombination wurde auch bei anderen Pilzen wie Neurospora, Aspergillus und Ustilago untersucht (CHANG u. TUVESON, 1967; LANIER et al., 1968; HOLLIDAY, 1967). In keinem Fall war ein wesentlicher Einfluß der uvs-Allele auf das Rekombinationsverhalten zu erkennen.

Unter den röntgensensiblen Mutanten stellt der von PUGLISI (1967) beschriebene diploide Hefe-Stamm eine Ausnahme dar, da sich die zugrundeliegende Mutation dominant auswirkt, während alle anderen bisher beschriebenen uvs- oder xs-Mutationen rezessiven Charakter haben. PUGLISI führt die Röntgenempfindlichkeit auf den Verlust eines Chromosoms zurück und nicht auf die Mutation eines Gens (PUGLISI, 1967).

1.3.2. Biochemischer Nachweis der Dunkelreparatur

Trotz der großen Anzahl strahlensensibler Mutanten bei Saccharomyces und anderen Eukaryonten wie Schizosaccharomyces pombe (HAEFNER u. HOWREY, 1967; NASIM, 1968), Ustilago maydis (HOLLIDAY, 1965), Aspergillus rugulosus (LENNOX u. TUVESON, 1967), Neurospora crassa (CHANG u. TUVESON, 1967), Chlamydomonas reinhardi (DAVIES, 1967 a u. b) und Proteus mirabilis (BÖHME, 1967) ist es bisher nur in vereinzelten Fällen gelungen, biochemisch nachzuweisen, daß

die Strahlensensibilität (ähnlich wie bei den Bakterienmutanten) auf den Verlust des Dunkelreparaturvermögens zurückgeführt werden kann. Für einige Protozoen (Tetrahymena pyriformis und Paramecium aurelia) und für kultivierte Säugetierzellen (HELA-Zellen) konnte der biochemische Nachweis für eine Dunkelreparatur UV-induzierter Schäden erbracht werden (BRUNK u. HANAWALT, 1967, 1969; SUTHERLAND, CARRIER u. SETLOW, 1968; CLEAVER, 1968; CLEAVER u. PAINTER, 1968), aber bei vielen anderen Eukaryonten war es bisher nicht möglich, die DNS spezifisch radioaktiv zu markieren. Bei vielen Pilzen wie z.B. den Hefen sind keine thymin-bedürftige Mutanten oder geeignete Viren gefunden worden, die eine Markierung analog wie bei den Bakterien erlauben.

Kürzlich haben JANNSEN et al. (1968) und JANNSEN, LOCHMANN u. MEGNET (1970) nachgewiesen, daß Hefezellen in der Lage sind, angebotenes radioaktiv markiertes Thymidinmonophosphat spezifisch in die DNS einzubauen. Diese Markierung ist jedoch nicht sehr deutlich, so daß es fraglich ist, ob bei dieser radioaktiven Markierung UV-induzierte Thymin-Dimere, die ja nur einen kleinen Teil des Hefegenoms ausmachen, verfolgt werden können.

Eine Methode nach UNRAU (1969) erlaubt es, mit Hilfe uracilbedürftiger Mutanten mit Uracil-2 C^{14} sowohl die DNS (Uracil wandelt sich in Cytosin um) als auch die RNS zu markieren und nach UV-Bestrahlung die gebildeten Pyrimidin-Dimere im DNS-Hydrolysat chromatographisch zu entdecken, wenn vorher die RNS vollständig extrahiert worden ist. Mit dieser Methode konnte inzwischen gezeigt werden, daß die UV-sensiblen Mutanten uvs 2 und uvs 4 (isoliert von COX u. PARRY, 1968) nicht in der Lage sind, UV-induzierte Dimere aus der DNS auszuschneiden, während die Mutante uvs 6 (UV- und RÖ-sensibel) und der Wildtypstamm dazu in der Lage sind. In uvs 6 werden nach UNRAU (1969) wahrscheinlich doppelt so viele Dimere ausgeschnitten wie im Wildtyp.

1.3.3. Wichtige Themenkreise für die Analyse der Strahlensensibilität

Obwohl es demnach also schon einzelne direkte biochemische Hinweise auf das Vorhandensein von Dunkelreparaturmechanismen bei Hefen gibt, besteht zweifellos noch ein großes Interesse, mit Hilfe weiterer strahlensensibler Mutanten Aufklärung über die Natur der zugrundeliegenden Reparaturmechanismen zu bekommen.

Analog zu den Befunden bei Bakterien lassen sich wertvolle Rückschlüsse auf die Existenz und die Wirkungsweise solcher Dunkelreparaturmechanismen gewinnen, wenn folgende vier Punkte näher untersucht werden:

1. Die genetische Kontrolle der Strahlensensibilität gegenüber UV- und Röntgenstrahlen.

2. Die Fähigkeit zur Reaktivierung:
   Werden z.B. UV-bestrahlte Hefezellen (Wildtyp) zeitlich verzögert ausgeplattet (sog. "delayed plating", PATRICK, HAYNES u. URETZ, 1964), so wird die Überlebensrate erheblich gesteigert (Reaktivierung). Daraus ergeben sich Hinweise auf das Reparaturvermögen der Zellen.
   Wird gleichzeitig das Photoreaktivierungsvermögen untersucht, können detaillierte Angaben über die während der Dunkelreaktivierung beseitigten Schäden gemacht werden, da durch PhR spezifisch UV-induzierte Pyrimidin-Dimere beseitigt werden.

3. Die Sensibilität gegen Einwirkung chemischer Agentien.
   Stickstofflost, salpetrige Säure, NNMG, 4-Nitrochinolin, Mitomycin C, Methylmethansulfonat u.a. erlauben eine Kennzeichnung spezifischer Veränderungen an der DNS und deren Reparatur.

4. Die Mutationsauslösung durch UV-Licht.
   Dadurch werden Hinweise erbracht, daß die DNS beteiligt ist.
   a) Induktion von Revertanten mit Hilfe von UV-Licht.

b) Fähigkeit zur Rekombination.
Daraus ergeben sich Hinweise auf die Rekombinationsmechanismen (rec^+ oder rec^- Charakter der strahlensensiblen Mutanten).

Von diesen angegebenen Punkten sollen im folgenden die Punkte 1 und 2 an drei ausgewählten Saccharomyces-Mutanten eingehend untersucht werden. Zu Punkt 4 a) liegen Untersuchungen vor (AVERBECK et al., 1970), die in die Diskussion einbezogen werden.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Saccharomyces-Stämme

Als Ausgangsstamm für die Induktion strahlensensibler Mutanten wurde der haploide und Isoleucin-Valin-bedürftige Stamm 211-1aM mit dem Paarungstyp α verwendet. Dieser Stamm, der sich gegenüber der Einwirkung von ultraviolettem Licht (UV) und Röntgenstrahlen (Rö) wie ein Wildtyp verhält, wurde der Sammlung weitestgehend isogener und homozygoter Hefestämme entnommen, die von LASKOWSKI aufgebaut worden sind (LASKOWSKI, 1960; LASKOWSKI, 1962).

Als Partner für verschiedene Kreuzungen diente vornehmlich der haploide, prototrophe Stamm 211-1b mit komplementärem Paarungstyp a, der gleichfalls aus der Stammsammlung stammt. Dieser Haplont neigt zu starker Klumpenbildung in flüssigem oder auf festem Nährmedium, verhält sich aber gegenüber UV- oder Rö wie ein Wildtyp-Stamm.

Aus einer Kreuzung zwischen den Stämmen 211-1aM (α) und 211-1b (a) ging der Diplont 2012 (aα) hervor, dessen Verhalten gegenüber Strahlen für die Strahlenresistenz diploider Wildtyp-Stämme typisch ist. Außerdem wurde der strahlensensible Isoleucin-Valin-bedürftige Haplont 1930 mit dem Paarungs-

typ α zu den Untersuchungen herangezogen. Diese Mutante war 1968 aus dem Stamm 211-1aM nach Behandlung mit dem Mutagen 1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin (NNMG) isoliert worden (LASKOWSKI et al., 1968).

2.1.1. Aufbewahrung der Stämme

Alle benutzten Hefestämme (auch die isolierten strahlensensiblen Stämme) wurden in kleinen Schrägagarröhrchen (Vollmedium) bei etwa 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Ungefähr alle 6 - 8 Monate wurden durch Anzüchten auf Röhrchen mit frischem Nährагar neue Stammkulturen angelegt.

2.2. Medien[1)]

2.2.1. Vollmedium (VM)

1 % Yeast-Extrakt (Difco)
0,5 % Pepton
2 % Glucose
2 % Agar (entfällt bei flüssigem Medium)
entmineralisiertes Wasser.

2.2.2. Synthetisches Minimalmedium (MM)

(Testmedium für Auxotrophien)
2 % Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Difco)
2 % Glucose
2 % Agar
(manchmal mit Zusatz von Aminosäuren verwendet:
100 mg/l Isoleucin
100 mg/l Valin)
entmineralisiertes Wasser

2.2.3. Natrium-Lactat-Medium (LM)

(Testmedium zur Erkennung von "petites")
0,5 % Pepton

1) Alle Medium (mit Ausnahme des MM) wurden im Autoklaven 15 min bei 123°C sterilisiert. Das MM wurde 15 min bei 115°C autoklaviert.

1 % Yeast-Extrakt (Difco)
2 % Natrium-Lactat
2 % Agar (entfällt bei flüssigem Medium)
entmineralisiertes Wasser.

2.2.4. Reines Agar-Medium (AM)

(Medium für die Agar-Haltung (AH) bestrahlter Zellen)
2 % Agar in entmineralisiertem Wasser.

2.2.5. Präsporulationsmedium n. MC CLARY

(MC CLARY, NULTHY u. MILLER, 1959)
2 % Agar
2 % Glucose
0,2 % (Ammoniumsulfat($(NH_4)_2SO_4$)
0,2 % Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)
0,5 % Yeast-Extrakt (Difco)
in entmineralisiertem Wasser.

2.2.6. Sporulationsmedium (n. MC CLARY verändert)

2 % Agar
0,82 % Kalium-Azetat
0,1 % Glucose
0,25 % Yeast-Extrakt (und/oder 0,25 % Malzextrakt)
0,1864 % Kaliumchlorid (KCl)
0,035 % Magnesiumsulfat
entmineralisiertes Wasser.

2.2.7. Puffer (pH : 4,8)

1/20 m KH_2PO_4 in entmineralisiertem Wasser.

2.3. Vorbereitung der Zellen für die Experimente

2.3.1. Anzüchten der Hefestämme

Von den Stammkulturen der jeweils benötigten Hefestämme

wurden kleine Zellproben mit sterilen Impfösen entnommen und in geschlossenen Reagensgläsern auf festem Schrägagar (3 ml VM) oder in flüssigem Nährmedium (5 ml VM) mechanisch geschüttelt bei 30°C zwei Tage im Brutraum angezüchtet.

2.3.2. Waschen der Zellen und fraktionierte Zentrifugation

Die Zellen wurden nach 48 Stunden (aus der stationären Wachstumsphase) vom Schrägagar mit Puffer abgespült und dreimal "gewaschen" (wiederholtes Abzentrifugieren und Wiederaufnehmen der Zellen in frischem Puffer), wodurch der größte Teil der noch an den Zellen haftenden Mediumreste beseitigt wurde. Neigten die verwendeten Stämme zu starker Klumpenbildung, wurde vor dem eigentlichen Waschvorgang noch eine Ultraschallbehandlung eingefügt. Durch Beschallung der Zellklumpen mit Hilfe eines BRANSON-Ultraschall-Desintegrators (Sonifer S 75) bei der Intensitätseinstellung 4 wurden die Klumpen bei einer Behandlung von 30 sec in Einzelzellen aufgelöst, ohne daß es zu Stoffwechselschädigungen kam (LASKOWSKI u. JANNSEN, 1967).

Die gewaschenen Zellen wurden in 8 ml Puffer aufgenommen und zwei bis drei Minuten fraktioniert zentrifugiert (bei 1000 Umdrehungen einer kleinen CHRIST-Zentrifuge) bei etwa 100 g, wodurch eine verhältnismäßig einheitliche Zellpopulation gewonnen werden kann. 2 ml des Überstandes, der vorwiegend Einzelzellen enthält, wurde abgehebert und diente als Ausgangssuspension.

2.3.3. Bestimmung des Zelltiters

Der Zelltiter in der Ausgangssuspension wurde mit einer BÜRKER-TÜRK-Zählkammer (Hämatocytometer) mikroskopisch bestimmt. Durch geeignete Verdünnungsschritte (meist Verdünnung 1 : 10 mit Puffer) wurden aus der Ausgangssuspension die für die Experimente erforderlichen Zellsuspensionen mit dem gewünschten Zelltiter hergestellt.

2.4. Behandlung mit dem Mutagen 1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin (NNMG) zur Induktion strahlensensibler Mutanten

3 ml einer Zellsuspension mit einem Zelltiter von 9 x 10^4 Zellen/0,1 ml Puffer wurden mit 6 ml einer frisch angesetzten NNMG-Lösung von 75 µg/ml versetzt (7,5 mg NNMG in 10 ml Puffer gelöst, entsprechend 750 µg/ml, diese Lösung mit Puffer 1 : 10 auf 75 µg/ml verdünnt). Zur Kontrolle wurden 3 ml der Zellsuspension mit 6 ml Puffer ohne NNMG-Zusatz verdünnt.

Die Zellen wurden bei 30°C der NNMG-Einwirkung ausgesetzt, wobei die Suspension geschüttelt wurde. Nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten ergab sich eine Überlebensrate von etwa 20 - 30 % Überlebenden.

Um die mutagene Wirkung noch zu verstärken, wurde die Dauer der NNMG-Behandlung auf 40, 50 und 60 Minuten verlängert. Die Behandlung wurde jeweils beendet durch Verdünnung der Suspension (Titer: 3 x 10^4 Zellen/0,1 ml Puffer) mit Puffer im Verhältnis 1 : 100.

Daraufhin wurden jeweils 0,1 ml Proben der behandelten und unbehandelten Zellsuspension auf Vollmedium ausgeplattet. Nach 4 - 5 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die aufgewachsenen Kolonien gezählt und die mutierten Zellklone mit Hilfe der Sektorenausstrichmethode und der Schnellmethode auf ihre Strahlenempfindlichkeit überprüft.

2.5. Sektorenausstrichmethode

Diese erstmals von LASKOWSKI angewandte Methode dient der schnellen Erkennung strahlensensibler Zellklone, die nicht mehr die Strahlenresistenz des Ausgangsstammes (Wildtyp) besitzen (LASKOWSKI et al., 1968).

Die Methode besteht darin, daß kleine Zellproben, z.B. von

nach NNMG-Behandlung aufgewachsenen Zellklonen, in radialen Sektoren (meist 8) auf einer VM-Platte ausgestrichen werden. Der offenen Petri-Schale (VM-Platte) wird eine runde Blei-Blende (2,5 mm dick, Ø 4,5 cm) mit einer Haltevorrichtung aus Messing spangenförmig aufgesetzt, so daß das Zentrum der Platte gegen UV- oder Röntgenbestrahlung abgedeckt ist (s. Abb. 1).

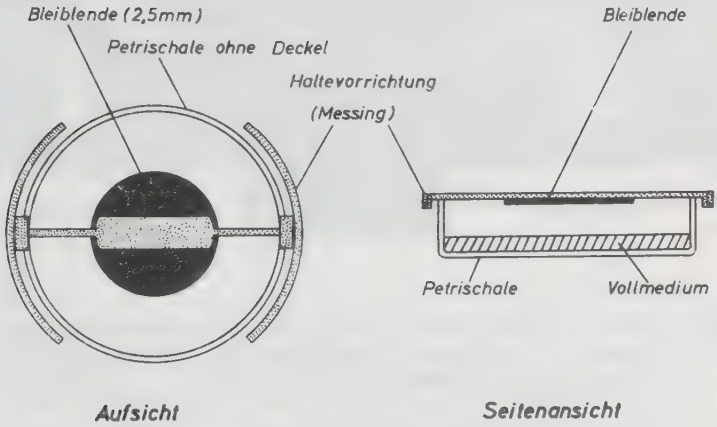

Abb. 1 - Blendenvorrichtung für die Sektorenausstrichmethode und für das Schnelltestverfahren zur Überprüfung der Strahlensensibilität.

Die aufzustrahlende UV- oder Röntgendosis wird so gewählt, daß der Kontrollstamm 211-1aM nur gering inaktiviert wird (z.B. UV-Dosis: 300 erg mm^{-2} entsprechend etwa 90 % Überlebenden, Röntgendosis: 3,3 krad entsprechend etwa 40 % Überlebenden). Nach zwei oder drei Tagen Inkubation bei 30°C zeigen deutlich reduziertes Wachstum in einzelnen be-

strahlten Sektorenabschnitten im Vergleich zu den fast unveränderten Ausstrichen des Ausgangsstammes eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit an (s. Abb. 2).

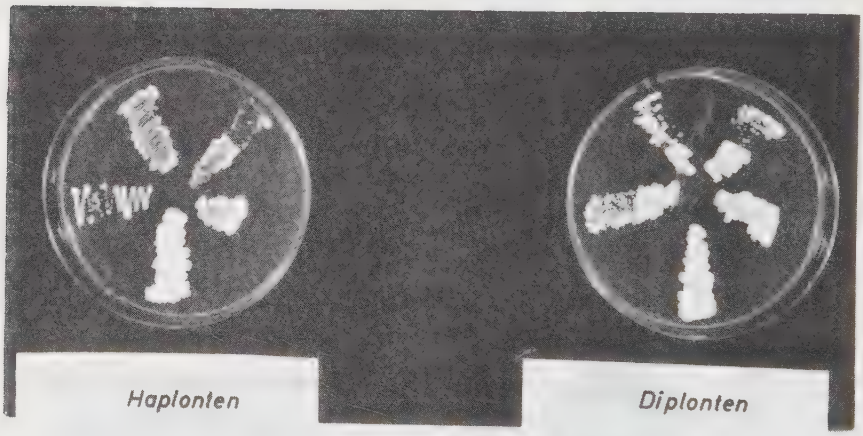

Abb. 2 - Sektorenausstrichplatten nach UV-Bestrahlung. Jeweils von unten ausgehend im Uhrzeigersinn Haplonten (eingestrahlte UV-Dosis: 300 erg/mm^2): resistenter Wildtypstamm 211-1aM und die sensiblen Stämme 1930, S 15, S 13 und S 14; Diplonten (eingestrahlte UV-Dosis:600 erg/mm^2): resistenter Wildtypstamm 2012 und die sensiblen Stämme 298, S 2095, S 2093 und S 2094.

Von zugehörigen unbestrahlten Sektorenabschnitten im Zentrum der VM-Platte können Proben der Zellklone abgeimpft und für weitere Versuche verwendet werden.

Diese Methode hat gegenüber der herkömmlichen Stempeltechnik (LEDERBERG, 1952) den Vorteil, daß Klumpungseffekte das Erkennen der strahlenempfindlichen Klone nicht erschweren und daß in den unbestrahlten Sektorenabschnitten im Zentrum immer genügend Zellmaterial zum Anzüchten der Stämme zur Verfügung steht.

2.6. Schnelltestverfahren

(Test zur schnellen Überprüfung der Strahlenempfindlichkeit)

Dieser Test ermöglicht den schnellen Nachweis verhältnismäßig geringer Strahlensensibilitätsunterschiede. Dazu wird eine Zellprobe (etwa 10^6 Zellen) des zu testenden Stammes auf eine VM-Platte mit 0,1 ml Puffer aufgebracht und gleichmäßig verstrichen. Das Zentrum der Platte wird mit einer Bleiblende abgedeckt (s. Abb. 1) und mit einer bestimmten UV- oder Röntgendosis eingestrahlt.

Nach 24 bis 48 Stunden Inkubation bei 30°C ist ein Zellrasen aufgewachsen. Das Verhältnis des Aufwuchses im abgedeckten Innenkreis zum äußeren bestrahlten Ring gibt ein Maß für die Strahlenempfindlichkeit des verwendeten Stammes bei der bestimmten Dosis. Eine typische Schnelltest-Plattenserie bei gleicher UV-Dosis zeigt für haploide und die entsprechenden homozygoten diploiden Stämme deutlich die Sensibilitätsunterschiede (s. Abb. 3).

Die Bestrahlungsdosis ist dabei so gewählt, daß ein Vergleichsstamm (z.B. der Wildtyp) keine Ringbildung erkennen läßt (entsprechend einer Überlebensrate von 50 - 90 %). Im allgemeinen können noch Sensibilitätsunterschiede bei Stämmen nachgewiesen werden, die sich in einem Dosisreduktionsfaktor von etwa 2 unterscheiden (untere Auflösungsgrenze). Bei gleicher Bestrahlungsdosis kennzeichnet das Fehlen eines Ringes den Wildtyp, ein schwacher Ring die Stämme mit mittlerer Strahlensensibilität(z.B. Stamm 1930) und ein deutlicher Ring (ohne jeglichen Aufwuchs in der bestrahlten Zone) die Stämme mit extremer Strahlenempfindlichkeit.

Das Schnelltestverfahren wurde hauptsächlich bei der Überprüfung der Strahlensensibilität der zahlreichen Sporenklone im Rahmen der Tetradenanalyse angewandt. In vielen Fällen konnte daher auf aufwendige Dosiseffektkurven verzichtet werden, da die zu erwartenden Sensibilitätsabstufungen deutlich im Schnelltest aufgelöst werden konnten.

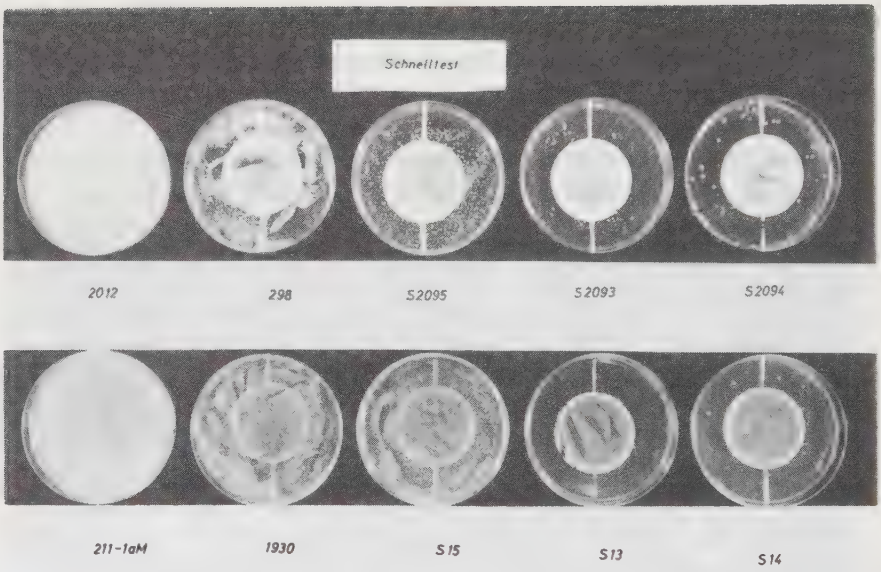

Abb. 3 - Schnelltest-Plattenserie nach UV-Bestrahlung. Obere Reihe homozygote Diplonten (applizierte UV-Dosis: 600 erg/mm^{-2}): resistenter Wildtyp-stamm, zwei Stämme mit mittlerer und zwei mit extremer UV-Sensibilität. Untere Reihe entsprechende haploide Stämme (applizierte UV-Dosis: 300 erg/mm^{-2}).

2.7. Strahlenquellen

Für die Bestrahlungen mit ultraviolettem Licht (UV) wurde eine Quecksilber-Niederdrucklampe HNS 12 (Osram) benutzt, die zu etwa 78 % Licht der Wellenlänge 2537 Å und zu etwa 9 % Licht der Wellenlänge 1850 Å abstrahlt (der restliche Wellenlängenanteil - 13 % - liegt im Bereich von 2800 - 4500 Å).

Die Dosisrate an der Oberfläche der bestrahlten Zellsuspension wurde bei einem Abstand von 42 cm zur Strahlenquelle mit einem Quantenflußmesser nach SCHAARSCHMIDT (1970) zu 5 erg mm^{-2} sec^{-1} bestimmt. Die für die Inaktivierung wirksame Dosis wurde für Zellsuspensionen mit den Titern 3 x 10^{2} - 3 x 10^{6} Zellen/0,1 ml der Oberflächendosis gleichgesetzt, da die Abschattung der Zellen in diesem

Titerbereich vernachlässigbar klein ist, wenn während der Bestrahlung mechanisch gerührt wird.

Alle Nachbehandlungen nach UV-Einwirkung erfolgten im gedämpften Licht einer gelbgrünen Lampe (Osram 4543 NDC), um unkontrollierte Photoreaktivierung zu vermeiden.

Zur Röntgenbestrahlung diente eine Machlett-Röhre, Typ OEG-60, mit Wolfram-Anode und Beryllium-Fenster ohne zusätzliche Filter. Bei einer Röhrenspannung von 50 kV, einem Heizstrom von 9 mA und einem Focus-Abstand von 15 cm betrug die mit einem Fricke-Dosimeter bestimmte absorbierte Strahlendosis 3,3 krad pro Minute bei einer Schichtdicke der Lösung von 2 - 2,5 mm.

2.8. Bestrahlung und Bestimmung des Koloniebildungsvermögens

Jeweils 2 oder 2,5 ml einer geeigneten Zellsuspension (s. Kapitel 2.3.1.1. und 2.3.1.2.) wurden in offenen Bestrahlungsschälchen (Ø 3 cm) bei Zimmertemperatur 22 - 25°C bestrahlt, wobei mit Hilfe eines Magnetrührers mechanisch gerührt wurde. Nach Bestrahlung wurde die Suspension, wie auch die unbestrahlte Kontrollsuspension, auf VM-Platten ausgeplattet (jeweils wenigstens 5 Platten pro Bestrahlungsprobe, 0,1 ml Suspension pro Platte). Alle notwendigen Verdünnungen wurden nach Möglichkeit vor Bestrahlung durchgeführt, so daß sofort ausgeplattet werden konnte. Der Zelltiter war dabei so eingestellt, daß etwa 30 - 350 Kolonien pro VM-Platte zu erwarten waren.

Das Überlebensvermögen der Zellen wurde definiert als Fähigkeit der Zellen, nach 4 - 5 Tagen Inkubation bei 30°C auf Nährmedium makroskopisch sichtbare Kolonien zu bilden. Die Überlebensrate in Prozent ist somit aus dem Verhältnis der Anzahl der aufgewachsenen Kolonien nach Bestrahlung zur Koloniezahl der unbestrahlten Kontrollen zu bestimmen.

2.8.1. Zur Darstellung der Versuchsergebnisse

Es wurden jeweils mindestens 3 - 10 Versuche unabhängig voneinander durchgeführt, wobei sich eine mittlere Abweichung von etwa 10 % ergab. Für die Darstellung in Form von Dosiseffektkurven wurden hauptsächlich Ergebnisse typischer Versuche ausgewählt. In einigen Fällen wurden die angegebenen Werte aus mehreren Versuchen gemittelt.

2.9. Methoden zur Reaktivierung nach Bestrahlung

2.9.1. Dunkelreaktivierung durch Agar-Haltung (AH)

Bestrahlte Proben wurden sofort nach Bestrahlung auf reinem Agar (ohne Nährstoffzusatz) ausgeplattet (vgl. SCHÄDEL, 1967) und bei 30°C inkubiert. In verschiedenen zeitlichen Abständen (8 - 74 Std.) wurden die Platten mit frischem VM (Temperatur: 40°C) vorsichtig überschichtet. Nach 4 - 5 Tagen Bebrütung wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien ausgezählt. Unbestrahlte Kontrollen wurden entsprechend behandelt und zur Berechnung der jeweiligen Überlebensrate herangezogen.
Maximale Dunkelreaktivierung ist nach etwa 48 Stunden zu erreichen.

Die Methode der Agar-Haltung unterscheidet sich von der herkömmlichen Puffer-Haltung ("Liquid-Holding" oder "delayed plating", vgl. PATRICK u. HAYNES, 1964) dadurch, daß die bestrahlten Zellen sofort nach Bestrahlung ausgeplattet und auf Agar festgelegt werden. Auf diese Weise kann die Zahl der aufgewachsenen Kolonien durch Zellverluste auf Grund von Sedimentation, unkontrollierter Zellvermehrung oder Sporulation nicht so stark verfälscht werden, wie es während der Liquid-Holding-Periode denkbar ist.

2.9.2. Photoreaktivierung

Bestrahlte Zellproben wurden nach der UV-Einwirkung dem Licht einer Leuchtstoffröhre (Osram L 20 W/70) bei einem

Abstand von 6 cm und einer Temperatur von 22 - 25°C ausgesetzt und auf VM ausgeplattet. Maximale Photoreaktivierung wurde meist schon nach 30 - 60 Minuten erreicht. Photoreaktivierung mit Hilfe einer 100 Watt-Lampe (Osram) führte zu gleichen Ergebnissen. Das Spektrum der ausgesandten Wellenlängen umfaßt den Bereich zwischen 3500 - 5600 Å.

Unbestrahlte Kontrollsuspensionen wurden in gleicher Weise mit Photoreaktivierungslicht behandelt. Nach 4 - 5 Tagen Inkubation konnte das Koloniebildungsvermögen UV-bestrahlter Zellen mit und ohne Photoreaktivierung (bezogen auf die entsprechenden Kontrollen) bestimmt werden.

2.10. Genetische Analyse

2.10.1. Durchführung der Kreuzungen

Die Kreuzungen wurden auf festem Vollmedium durchgeführt. Dazu wurden zwei Stämme mit komplementärem Paarungstyp auf zwei VM-Platten ausgestrichen und angezüchtet. Nach 12 Stunden Inkubation wurden mit Hilfe eines Samttuches die Zellen beider Stämme auf eine VM-Platte überstempelt. Während der nachfolgenden 4stündigen Bebrütung bei 30°C kam es zur Ausbildung von Zygoten, die sich mikroskopisch erkennen ließen.

2.10.2. Paarungstypbestimmung

Da nur Zellen mit komplementärem Paarungstyp (PT) miteinander kopulieren und Zygoten bilden, kann aus dem Auftreten von Zygoten in Kreuzungen mit Stämmen bekannten Paarungstyps auf den PT des jeweiligen Partners geschlossen werden. Als wichtiges genetisches Merkmal wurden auf diese Weise die Paarungstypen der neuisolierten Hefemutanten und Sporenklone aus der Tetradenanalyse der Diplonten bestimmt.

2.10.3. Isolierung der Diplonten

Von gebildeten Zygoten und den umliegenden haploiden Zellen wurden Verdünnungsausstriche auf festem Nähragar gemacht. Nach 2tägiger Bebrütung waren die aus den Zygoten hervorgegangenen diploiden Zellen zu großen Kolonien herangewachsen, die sich deutlich von den wesentlich langsamer wachsenden kleinen Kolonien haploider Eltern unterscheiden ließen. Zellproben der großen Kolonien wurden zwei Tage in flüssigem VM angezüchtet und mikroskopisch analysiert. Zellen der diploiden Stämme unterscheiden sich von haploiden Zellen durch das größere Zellvolumen und darin, daß sie nicht zu Klumpenbildung neigen.

Daß es sich um echte aα-Diplonten handelt, die aus einer Kreuzung haploider Eltern mit dem PT a und α hervorgegangen sind und nicht um PT-homozygote aa-oder αα-Diplonten, die spontan aus Haplonten durch endomitotische Genomverdopplung entstehen können, wurde durch Überprüfung folgender Eigenschaften nachgewiesen:

1. aα-Diplonten können sporulieren (im Gegensatz zu aa oder αα-Diplonten).
2. aα-Diplonten bilden keine Zygoten aus, wenn sie mit Zellen vom Paarungstyp a oder α zusammengebracht werden.

2.10.4. Sporulation und Tetradenanalyse

Das Sporulationsvermögen von PT-heterozygoten Stämmen kann auf folgende Weise überprüft werden:
Der diploide aα-Stamm wird auf Präsporulationsmedium 24 Stunden angezüchtet, danach mit Puffer abgespült und zweimal gewaschen, abzentrifugiert, in 10 ml flüssigem Sporulationsmedium aufgenommen und in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30° geschüttelt. Nach 3 - 4 Tagen werden Proben entnommen und mikroskopisch auf die Anwesenheit von gebildeten Asken durchgemustert. Sind Asken vorhanden, die jeweils vier Sporen einer Tetrade, d.h. die zusammengehörigen haploiden Reifeteilungsprodukte enthalten, so ist eine genetische Analyse möglich.

Zur Analyse der vier Meioseprodukte müssen aus den Asken die vier einzelnen Sporen isoliert werden. Dazu werden die Asken abzentrifugiert und in 5 ml Puffer aufgenommen. 1 ml dieser Suspension wird mit 0,5 ml einer 1 : 5 verdünnten Schneckenenzymlösung (0,8 ml Suc digestif d'helix pomatia, L'Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers-Seine, 3,2 ml Puffer) versetzt und 12 Stunden inkubiert.

Die Askuswand wird auf diese Weise weitgehend aufgelöst und die vier noch lose zusammenhängenden Sporen können mit Hilfe eines Mikromanipulators (FONBRUNE, Paris) auf dünnen VM-Plättchen in einer geeigneten Kammer im hängenden Tropfen isoliert werden. Während 2tägiger Bebrütung wachsen die getrennten Sporen einer Tetrade zu makroskopisch sichtbaren Klonen auf. Durch Analyse der Eigenschaften der Sporenklone und der Aufspaltungsverhältnisse für bestimmte genetische Marken wie Paarungstyp, Stoffwechselbedürftigkeiten und Strahlenempfindlichkeit kann der Erbgang bestimmter Merkmale genetisch genau analysiert werden. Meistens werden vier der aufgewachsenen Sporen einer Tetrade auf Schrägagar (VM) gelegt und für weitere Untersuchungen verwendet. Sind jedoch nur wenig Tetraden mit jeweils vier vitalen Sporen vorhanden, werden auch Tetraden benutzt, die nur drei vitale Sporen enthalten.

Wurden während der Sporulation nur wenig Asken gebildet, so daß eine Isolierung mit dem Mikromanipulator schwierig war, wurde das Massensporulationsverfahren angewandt (EMEIS u. GUTZ, 1958). Die Ansätze in flüssigem Sporulationsmedium, die einige wenige Asken enthielten, wurden abzentrifugiert, mit Puffer 2mal gewaschen, wieder abzentrifugiert, in 3 ml Puffer aufgenommen und mit gleichen Teilen einer (1:2) verdünnten Schneckenenzymlösung versetzt und 16 Stunden bei 30°C geschüttelt. Darauf wurden sie 1mal mit Puffer gewaschen, abzentrifugiert, mit 4 ml einer Tween 80 - Lösung (0,5 ml Tween 80 in 100 ml Puffer) aufgenommen und abzentrifugiert, mit 4 ml Tween 80 nochmals aufgenommen und 45 sec mit Ultraschall (BRANSON-Desintegra-

tor Sonifer S 75) bei Intensitätsstufe 4 behandelt, in 50 ml Kölbchen mit 2 ml Paraffinöl übertragen und unter Rühren kräftig geschüttelt.

Danach wurde zentrifugiert, die überstehende Ölschicht (die hauptsächlich die lipophilen Hefesporen und nur sehr wenige lipophobe vegetative Hefezellen enthält) mit 2 ml Tween 80 und 2 ml Paraffinöl nochmals in 50 ml Kölbchen kräftig geschüttelt und danach abzentrifugiert. 0,2 bzw. 0,5 ml des Ölüberstandes wurden auf Vollmediumplatten aufgetropft, verstrichen und mit Glasspatel auf drei weitere VM-Platten übertragen. Nach 3 - 4 Tagen Bebrütung bei 30°C konnten die aufgewachsenen Sporenklone auf Schrägagar gelegt und ihre genetischen Eigenschaften getestet werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Induktion und Isolierung strahlensensibler Mutanten

Mit Hilfe des Mutagens 1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin (NNMG), dessen mutagene Wirkung hauptsächlich in einer Methylierung des Guanins und anderer Basen der DNS oder in einer Desaminierung des Adenins oder des Guanins besteht (LINGENS, RAU u. SÜSSMUTH, 1968), wurden in Zellen des haploiden Ausgangsstammes 211-1aM strahlensensible Mutanten induziert.

Die zunächst nach einer NNMG-Behandlung von 30 Minuten (NNMG-Konzentration 50 µg/ml, Überlebensrate 20 - 30 %) beobachtete verhältnismäßig geringe Ausbeute an Mutanten konnte durch die Wahl anderer Behandlungszeiten (15 - 60 Minuten) vergrößert werden. Wie die Überlebenskurve für Zellen des Stammes 211-1aM (s. Abb. 4) nach NNMG-Behandlung zeigt, verläuft die Inaktivierungskurve im wesentlichen exponentiell vergleichbar mit Befunden anderer Autoren bei Hefen (Saccharomyces) und Bakterien (E. coli) (LINGENS u. CLIMANNS, 1966; CERDA-OLMEDO u. HANAWALT, 1967; WITKIN, 1967; SÜSSMUTH, CHANDRA, WACKER u. LINGENS, 1969).

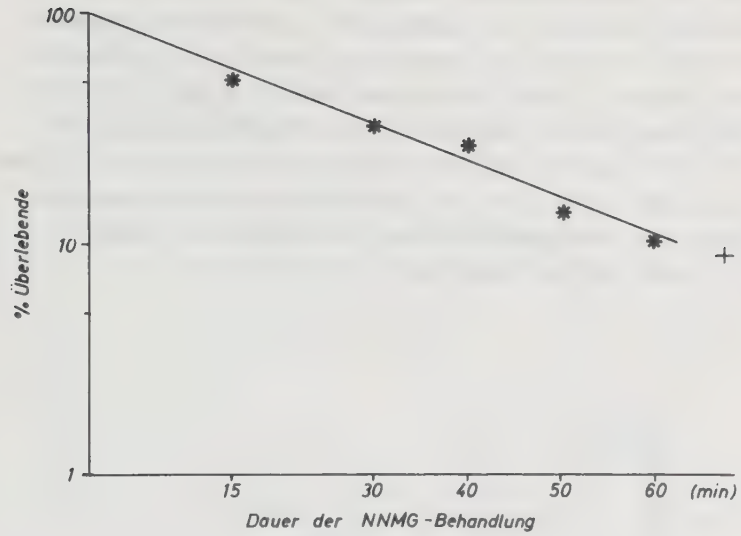

Abb. 4 - Inaktivierungskurve nach NNMG-Behandlung für den haploiden Hefe-Wildstamm 211-1aM

Auf die Erarbeitung optimaler Bedingungen für die Induktion strahlensensibler Mutanten mit NNMG, wie es für die Auslösung anderer Mutanten bei E. coli, Saccharomyces und Bacillus subtilis beschrieben worden ist (SÜSSMUTH u. LINGENS, 1969), wurde verzichtet, da es nur darauf ankam, einige wohldefinierte strahlensensible Mutanten zu erzeugen, die als Grundlage für weitere Untersuchungen verwendet werden konnten.

Insgesamt sind nach NNMG-Behandlung unter 8000 aufgewachsenen Zellklonen 134 Mutanten isoliert worden, die sich im Sektorenausstrichtest (s. Abb. 2) durch erhöhte Strahlenempfindlichkeit im Vergleich zum Wildtyp (211-1aM) auszeichnen. Neun der isolierten Stämme sind UV-sensibel und 59 röntgenempfindlich, 66 sind sensibel gegen die Einwirkung

beider Agentien.

Bei der differenzierteren Überprüfung der Mutanten im Schnelltest (s. Abb. 3) ergab sich, daß die meisten Mutanten nur schwach strahlensensibel sind. Die Strahlenempfindlichkeit liegt im allgemeinen zwischen der mittleren Strahlensensibilität der von LASKOWSKI isolierten Mutante 1930 und der Resistenz des Wildtypstammes 211-1aM. Ein typisches Spektrum der gefundenen strahlensensiblen Mutanten mit verschiedenen Empfindlichkeiten gegen UV- und Röntgenstrahlen zeigt Abb. 5a und 5b.

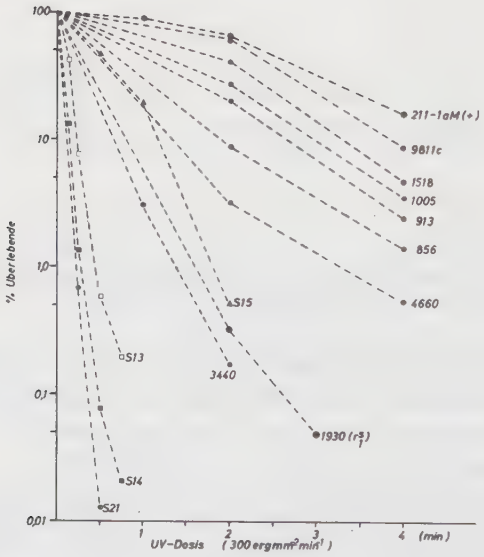

Abb. 5a - UV-Dosiseffektkurven für einige isolierte strahlensensible Mutanten (haploid).
Typisches Empfindlichkeitsspektrum.

Die Sensibilitätsverteilung insbesondere nach UV-Bestrahlung

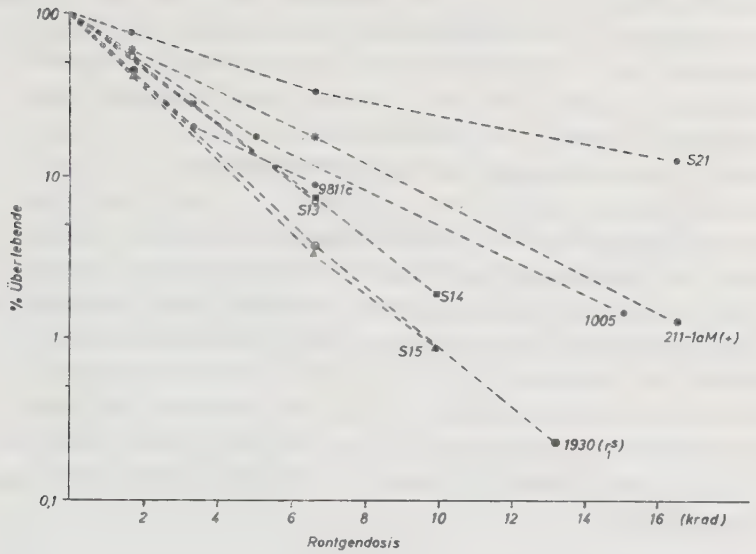

Abb. 5b - Röntgendosiseffektkurven für einige der isolierten haploiden strahlensensiblen Mutanten. Typisches Empfindlichkeitsspektrum: Folgende Mutanten sind nicht dargestellt, da sie in ihrer Sensibilität den vorhandenen Überlebenskurven entsprechen: 1518 wie 211-1aM, 856 wie 9811c, 3440 u. 4660 wie 1930, 913 wie 1005.

erinnert an das entsprechende Empfindlichkeitsspektrum der 96 von COX u. PARRY isolierten UV-sensiblen Stämme (COX u. PARRY, 1968). Der Bereich der Dosiseffektkurven zwischen dem Stamm 1930 mit dem r_1^s-Gen[1)] und dem Stamm 211-1aM ist durch viele Mutanten verhältnismäßig schwacher Sensibilität gekennzeichnet. Mit Hilfe des Schnelltestes (s. Abb. 3) wurden Mutanten ausgewählt, die folgende Kriterien erfüllten:

---

1) Die mutierten Gene, die für die Strahlensensibilität verantwortlich sind, werden einem Vorschlag LASKOWSKIs folgend mit dem Symbol r^s ("radiation sensitive") bezeichnet (LASKOWSKI et al., 1968).

1. Vorhandensein einer wohl zu definierenden, möglichst starken Sensibilität gegenüber UV- und/oder Röntgenbestrahlung.
2. Weitestgehende genetische und phänotypische Übereinstimmung mit den Eigenschaften des Wildtyps (mit Ausnahme der Strahlenempfindlichkeit) z.B. hinsichtlich Wachstum, Atmung, Paarungsverhalten, Stoffwechselbedürftigkeit, Neigung zu Klumpenbildung usw.

Diesen Kriterien entsprechend wurde auf die weitere Untersuchung der schwach sensiblen Stämme verzichtet (Stämme 865 - 9811c in Abb. 5a). Da der Stamm 4660 die Fähigkeit zur Kopulation verloren hatte und der Stamm 3440 sich als atmungsdefekt herausstellte, wurden auch diese beiden Stämme nicht weiterverwendet. Die verbleibenden Mutanten von mittlerer und extremer UV-Sensibilität, die Stämme S 15 sowie die Stämme S 21, S 13 und S 14, wurden zu eingehenden Analysen herangezogen.

In den Dosiseffektkurven nach Röntgenbestrahlung (s. Abb. 5b) ist die Resistenz des Stammes S 21 besonders auffällig, die etwa der eines aα-Diplonten (Wildtyp) entspricht. Der Stamm neigt zur Bildung aberranter und teilweise selbstdiploidisierter Zellen, die möglicherweise für die Röntgenstrahlenresistenz verantwortlich sind. Eine genetische Instabilität zeigte sich bei der Tetradenanalyse eines diploiden Hybriden, der aus einer Kreuzung des Stammes S 21 mit einem haploiden Wildtyp-Stamm (211-1b) hervorgegangen war. Die Sporen einer Tetrade spalteten jeweils völlig unregelmäßig für den Paarungstyp und das Merkmal der extremen UV-Sensibilität auf. Wurden geeignete UV-sensible Sporenklone ausgewählt und mit einem Wildtyp-Haplonten gekreuzt, so ergab die Analyse der Tetraden des gebildeten Hybriden wiederum eine irreguläre Segregation. Dieses ungewöhnliche meiotische Verhalten erinnert an die Eigenschaften von P^{32}-resistenten Hefestämmen mit abnormaler Meiose, die von MOUSTACCHI et al. (1967) beschrieben wurden.

Trotz des interessanten Verhaltens gegenüber UV- und Röntgenstrahlen wurde der Stamm S 21 wegen der genetischen Instabilität, die jede genetische Analyse unmöglich erscheinen läßt, nicht weiter untersucht.

3.2. Genetische Analyse

Eine wesentliche Voraussetzung für die Untersuchung von Reparaturprozessen, die in Zellen nach Bestrahlung ablaufen können, ist eine Prüfung, ob die Strahlenempfindlichkeit der isolierten Mutanten genetisch begründet ist (analog zu den strahlensensiblen Mutanten der Bakterien, vgl. ADLER, 1966) oder durch plasmatische Veränderungen verursacht wird.

Einer genetischen Analyse sind allerdings nur Mutanten zugänglich, die folgende Bedingungen erfüllen:

1. Sie müssen sich mit Partnern komplementären Paarungstyps fruchtbar paaren lassen.
2. Die Hybriden müssen Asken mit keimungsfähigen Sporen bilden.

Die drei strahlensensiblen Stämme S 13, S 13 und S 15, die nach NNMG-Behandlung aus dem haploiden Stamm 211-1aM erhalten worden sind, genügen beiden Anforderungen: Sie besitzen die Fähigkeit, Zygoten auszubilden, wenn sie mit a-Zellen gepaart werden, und die Hybriden produzieren keimungsfähige Sporen.

3.2.1. Kreuzungen und Herstellung heterozygoter Diplonten

Um die Vererbung der einzelnen Strahlensensibilitätsmerkmale untersuchen zu können, waren bestimmte geeignete Kreuzungen notwendig. In einem Stammbaum ist in übersichtlicher Weise die Abfolge der verschiedenen Kreuzungen und damit der Aufbau diploider Stämme dargestellt (s. Abb. 6). Als wichtiger Vergleichsstamm ist die Mutante 1930 eingefügt (LASKOWSKI et al., 1968).

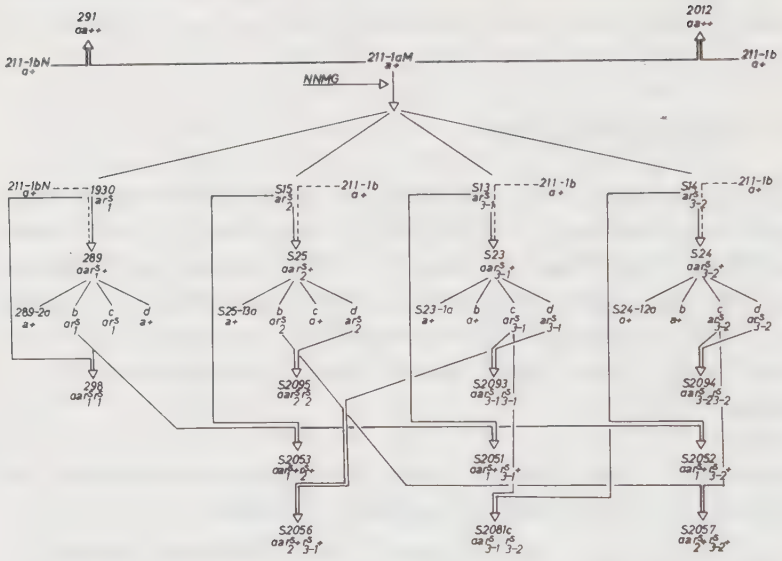

Abb. 6 - Stammbaum der nach Einwirkung von NNMG aus dem haploiden Wildtyp-Stamm 211-1aM hervorgegangenen strahlensensiblen Mutanten und der abgeleiteten homozygoten und heterozygoten diploiden Stämme. (Paarungstypsymbole: α und a (Alpha)).

Wie aus dem Stammbaum zu ersehen ist (Abb. 6), wurden die isolierten Mutanten S 13, S 14 und S 15 (PT α) jeweils mit dem haploiden Wildstamm 211-1b (PT a) gekreuzt. Auf diese Weise entstanden diploide Stämme, die heterozygot in Bezug auf die Merkmale PT und Strahlensensibilität sind: S 23, S 24 und S 25. Diese drei Hybriden bildeten bereitwillig Asken. Vier Sporen der Asken wurden jeweils auf VM angezüchtet. Allerdings keimten einige der auf frisches VM aufgebrachten Sporen nicht aus und bildeten keine makroskopisch sichtbaren Kolonien, obwohl mikroskopisch in einigen Fällen ein oder zwei Teilungen nachgewiesen werden konnten.

Einen Überblick über die Sporulation und Tetradenanalyse bei den Hybriden gibt Tabelle I.
Trotz des reduzierten Sporenaufwuchses (60 - 87 % der Sporen insgesamt) wurde die Tetradenanalyse nach Möglichkeit an wenigstens zwanzig vollständigen Tetraden mit vier fertilen Sporen pro Askus (bei den Hybriden S 25 und S 24), in einigen Fällen auch teilweise an unvollständigen Tetraden mit nur drei fertilen Sporen (z.B. beim Hybriden S 23) durchgeführt (s. Tabelle I).

Von allen Sporenklonen wurde der Paarungstyp bestimmt. Einige Sporenkulturen, die von den Hybriden S 23 und S 25 abstammten, bildeten jedoch weder Zygoten mit 211-1aM (PT α) noch mit 211-1b (PT a) aus, so daß der Paarungstyp unklar blieb.

Mit den wenigen Ausnahmen, die bei Hefen manchmal anzutreffen sind, wurde in allen getesteten Tetraden eine 2 : 2 Aufspaltung hinsichtlich des Paarungstyps beobachtet. Das spricht für die exakte Erfassung der zu einer Tetrade gehörenden Sporen bei der Mikromanipulation.

Weiterhin wurde die Strahlensensibilität der einzelnen Sporenklone überprüft. Da einige Sporenkulturen zu starker Klumpenbildung neigen (Abkömmlinge der Stämme 211-1b und S 13), wodurch eine gewisse Röntgenstrahlenresistenz vorgetäuscht werden kann, wurde vor allem die Empfindlichkeit gegenüber UV-Bestrahlung im Schnelltest untersucht. Ob jeweils die UV-sensiblen Sporen einer Tetrade auch gleichzeitig gegenüber Röntgenstrahlen sensibel sind, konnte demnach wegen der Klumpungseffekte nicht immer eindeutig abgesichert werden.

In einigen Fällen wurden die Ergebnisse des Schnelltestes durch Dosiseffektkurven abgesichert, wie es in Abb. 7 für die Tetrade S 23-1 dargestellt ist.

Alle auf ihre Sensibilität gegenüber UV überprüften Tetra-

Tabelle I

SPORULATION UND TETRADENANALYSE BEI HETEROZYGOTEN DIPLONTEN (r^s_x +)

Stamm-nummer	Genotyp	analysierte Tetraden (insgesamt)	TETRADEN Sporen (vital:letal) 4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Keimungsrate der Sporen	Segregation der UV-Sensibilität (res.:sens.)
2012	+ +	23	10	8	3	0	2	78 %	-
289 1)	r^s_1 +	34	5	16	7	4	2	63 %	2:2
S 25	r^s_2 +	48	34	3	1	0	10	77 %	2:2
S 23	r^s_{3-1} +	44	9	19	4	5	7	60 %	2:2
S 24	r^s_{3-2} +	36	24	10	0	0	2	87 %	2:2

1) Der Hybride 289 ist zum Vergleich angegeben.

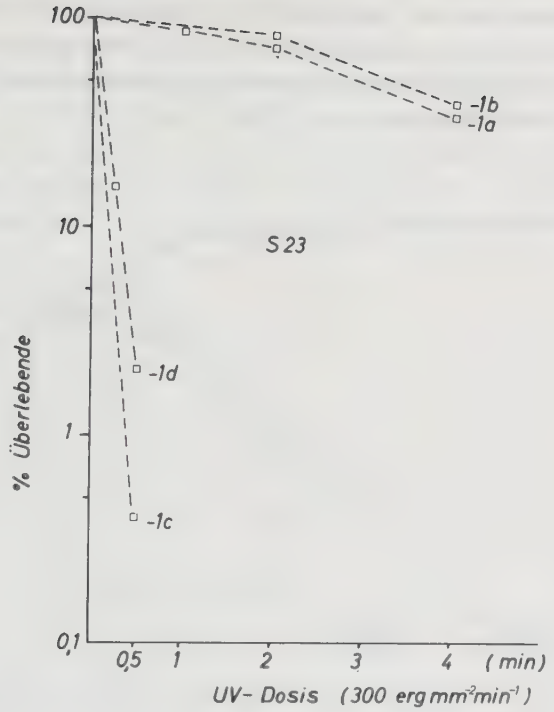

Abb. 7 - UV-Dosiseffektkurven der Sporen 1a - 1d einer Tetrade des Hybridstammes S 23.

den zeigten eine klare 2:2 Aufspaltung in zwei sensible und zwei resistente (Wildtyp) Sporen (s. Tabelle I). Eine solche 2:2 Segregation ist bei jeweils etwa 20 getesteten Tetraden nur zu erwarten, wenn eine Einfaktorkreuzung zugrundeliegt, und ist gleichzeitig ein Beweis dafür, daß die Strahlensensibilität genetisch kontrolliert wird und auf einzelne mutierte Gene (die r^s-Gene, s. Fußnote S. 35) zurückzuführen ist.

Da die Hybriden des Typs (r^s+), die Diplonten S 23, S.24 und S 25, wie der homozygote Wildtypdiplont 2012 (++) re-

sistent gegenüber UV sind, was auch für den Hybriden 289 (r^s_1+) nachgewiesen wurde (LASKOWSKI et al., 1968), verhalten sich alle bisher isolierten r^s-Gene rezessiv. In Abb. 8 sind die Überlebenskurven für die Hybridstämme nach UV-Bestrahlung aufgetragen.

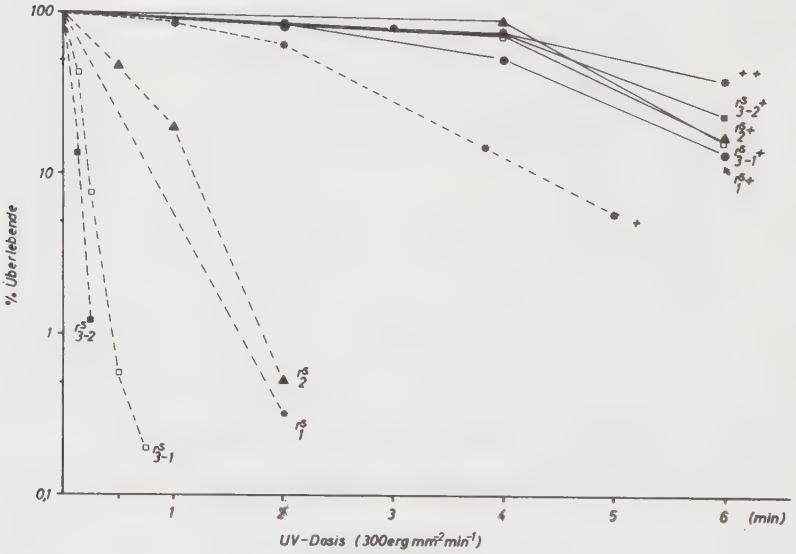

Abb. 8 - UV-Dosiseffektkurven der Hybridstämme des Typs (r^s+) und des homozygoten Wildtyp-Diplonten (++). Zum Vergleich sind die Überlebenskurven der entsprechenden Haplonten (r^s) und (+) gestrichelt angegeben.

Um entscheiden zu können, ob die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Mutanten 1930, S 13, S 14 und S 15 auf verschiedene durch Mutation veränderte Gene oder auf Mutationen innerhalb eines Gens zurückgehen, wurden geeignete diploide Stämme hergestellt und genetisch analysiert.

Die strahlensensiblen Stämme S 15, S 13 und S 14 wurden mit bestimmten geeigneten Sporenklonen vom komplementären Paa-

rungstyp a, die durch Sporulation der Hybridstämme 289, S 23 und S 25 gewonnen wurden, in den sechs möglichen Kombinationen gekreuzt (s. Stammbaum Abb. 6). Das führte zu sechs Diplonten mit der Bezeichnung S 2053, S 2051, S 2052, S 2056, S 2081c und S 2057, deren Strahlensensibilität im Schnelltest und in Dosiseffektkurven nach UV-Bestrahlung bestimmt wurde. In Abb. 9 sind die UV-Dosiseffektkurven dargestellt.

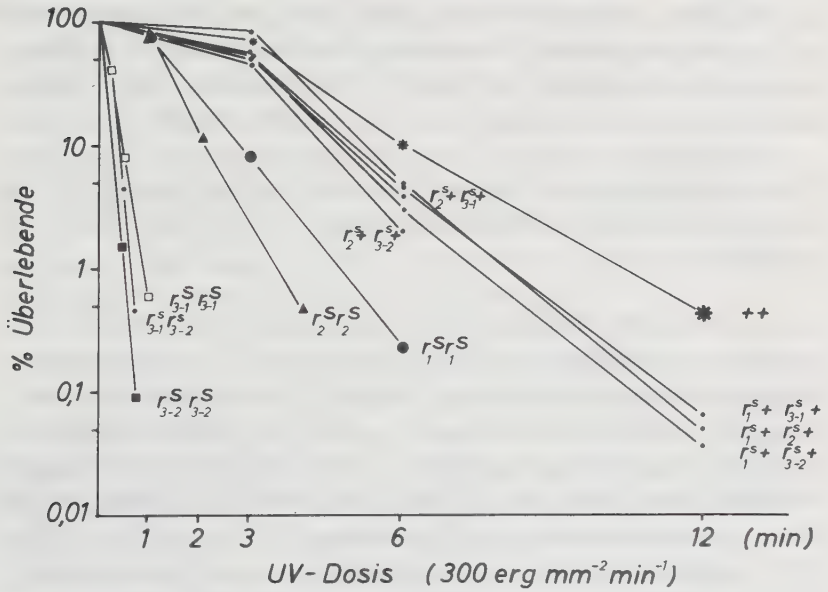

Abb. 9 - UV-Dosiseffektkurven von Diplonten
- homozygot für eines der r^s-Gene: die Stämme 298 ($r^s_1 r^s_1$), S 2095 ($r^s_2 r^s_2$), S 2093 ($r^s_{3-1} r^s_{3-1}$), S 2094 ($r^s_{3-2} r^s_{3-2}$) und S 2081c ($r^s_{3-1} r^s_{3-2}$)
- heterozygot für jeweils zwei der r^s-Gene:
S 2053 (r^s_1+ r^s_2+), S 2051 (r^s_1+ r^s_{3-1}+),
S 2052 (r^s_1+ r^s_{3-2}+), S 2056 (r^s_2+ r^s_{3-1}+),
S 2057 (r^s_2+ r^s_{3-2}+) und homozygoter Wildtypdiplont 2012 (++).

Mit Ausnahme des Stammes S 2081c, der extrem UV-empfindlich ist, erweisen sich die Stämme S 2051, S 2052, S 2053, S 2056 und S 2057 als fast genauso resistent wie der entsprechende homozygote Wildtypdiplont 2012. Die Dosisreduktionsfaktoren, bestimmt für den Überlebensbereich LD_1, liegen zwischen 1,3 - 1,6. Aus diesen Befunden geht hervor, daß in diesen Diplonten eine Komplementation der UV-Sensibilität stattgefunden hat, die jedoch aus nicht weiter analysierten Gründen nicht ganz zu der Strahlenresistenz des Wildtyp-Diplonten führt. Damit ist der Nachweis erbracht, daß in den haploiden Eltern der Hybriden S 2051, S 2052, S 2053, S 2056 und S 2057 die Strahlensensibilität durch Mutationen an verschiedenen Loci verursacht ist.

Die in den haploiden Eltern 1930, S 15, S 13 und S 14 mutierten Loci werden mit den Symbolen r^s_1, r^s_2 und r^s_3 bezeichnet.

Da der stark UV-sensible Diplont S 2081c, der aus einer Kreuzung der Mutante S 14 mit einem von S 13 abgeleiteten Sporenklon hervorging (vgl. Abb. 6), keine Komplementierung der UV-Sensibilität zeigt, geht die Strahlenempfindlichkeit der Stämme S 13 und S 14 offenbar auf Mutationen in einem homologen Gen zurück. Die beiden Mutanten werden daher durch die Symbole r^s_{3-1} (Stamm S 13) und r^s_{3-2} (Stamm S 14) gekennzeichnet, womit ausgedrückt werden soll, daß verschiedene Allele innerhalb eines Gens mutiert sind. Diese Annahme erscheint nicht unberechtigt, da sich die beiden Stämme S 13 und S 14 1. hinsichtlich der Strahlensensibilität und 2. im Reaktivierungsvermögen nach UV-Bestrahlung unterscheiden.

Der Nachweis für die Kopplung oder Nichtkopplung der für die Strahlenempfindlichkeit verantwortlichen Gene (r^s_1, r^s_2 und r^s_3) kann nur durch Tetradenanalysen erbracht werden. Die heterozygoten diploiden Stämme des Typs ($r^s_x + r^s_y +$) wurden daher durch Aufbringen auf Sporulationsmedium zur Sporulation angeregt, um das notwendige Ausgangsmaterial

für die genetische Untersuchung zu erhalten. In einigen Fällen, insbesondere bei heterozygoten Diplonten, die das r_1^s-Gen enthielten, wurde eine sehr geringe Sporenbildung beobachtet. Die Sporulation des Stammes S 2051 ($r_1^s + r_{3-1}^{s+}$) erbrachte z.B. so wenig Asken und die Aufwuchsrate der isolierten Sporen war so gering, daß das Massensporulationsverfahren angewandt werden mußte, um wenigstens noch einige Einzelsporen für die Analyse zu erfassen.

In Tabelle II ist das Ergebnis der Sporulation und Tetradenanalyse bei den heterozygoten Diplonten angegeben. Während die Stämme S 2051, S 2052, S 2053 und S 2081c nur sehr wenig Asken bildeten, erbrachte die Sporulation bei S 2056 und S 2057 gute Ergebnisse. Da die Aufwuchsrate der getrennten Sporen teilweise unter 75 %, gemessen an der Gesamtzahl der mikromanipulatorisch isolierten Sporen, lag,z.B. beim Stamm S 2081c wuchsen nur 48 % der Sporen auf, wurde die Analyse sehr erschwert.

Da die Stämme aus einer Zweifaktorenkreuzung des Typs a r_x^{s+} X $\alpha + r_y^s$ entstanden waren, konnten nach Sporulation drei Typen von Tetraden (bei diesen Saccharomyces Stämmen handelt es sich um ungeordnete Tetraden, da die Reihenfolge der Sporen im Askus nicht festgelegt ist) erwartet werden: Parentale Ditypen (PD), Rekombinationsditypen (RD) und Tetratypen (T). (Eine ausführliche Darstellung der nach einer Zweifaktorenkreuzung zu erwartenden Tetradentypen findet sich bei ESSER u. KUENEN,1965).

Parentaler Dityp	Rekombinationsdityp	Tetratyp
r_x^s,+	r_x^s,r_x^s	+,+
r_x^s,+	r_x^s,r_x^s	r_x^s,r_y^s
+,r_y^s	+,+	r_x^s,+
+,r_y^s	+,+	+,r_y^s

Tabelle II

SPORULATION UND TETRADENANALYSE BEI DOPPELT HETEROZYGOTEN DIPLONTEN ($r^s_x + r^s_y +$)

Stamm-nummer	Genotyp	analys. Tetraden (insges.)	TETRADEN Sporen (vital:letal) 4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Keimungsrate der Sporen	SEGREGATION der UV-Sensibilität PD	RD	T
2012	+ +	23	10	8	3	0	2	78 %	21	-	-
S 2053	r^s_1+, r^s_2+	23	5	15	2	0	1	75 %	3	6	11
S 2051	$r^s_1+, r^s_{3-1}+$	(25)[1]	MS[1]	MS[1]	MS[1]	MS[1]	MS[1]	-	(38(r^s_1+),20($+r^s_{3-1}$)od.($r^s_1 r^s_{3-1}$),39(++))[2]		
S 2052	$r^s_1+, r^s_{3-2}+$	20	1	12	5	2	0	65 %	4	5	4
S 2056	$r^s_2+, r^s_{3-1}+$	20	12	4	3	0	1	83 %	4	4	7
S 2057	$r^s_2+, r^s_{3-2}+$	20	20	0	0	0	0	100 %	7	6	7
S 2081c[3]	$r^s_{3-1} r^s_{3-2}$	72	8	14	22	21	7	48 %	13	-	-

1) wegen Massensporulation keine genauere Analyse möglich.

2) Anzahl haploider Sporenklone, nicht Tetradenanzahl.

3) S 2081c ist ein heteroallelischer Stamm.

Die Sporen mit den einzelnen Genotypen lassen sich durch eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit unterscheiden:

Die haploiden Sporen vom Genotyp (+,+) sind strahlenresistent wie der haploide Wildtyp.

Die haploiden Sporen vom Genotyp (r^s_x,+) oder (+,r^s_y) sind strahlensensibel wie die entsprechenden haploiden (r^s_x,+) oder (+,r^s_y)-Mutanten.

Die haploiden Sporen vom Genotyp (r^s_x,r^s_y) zeigen meistens eine etwas stärkere Sensibilität als die entsprechenden haploiden Einzelmutanten (r^s_x,+) oder (+,r^s_y).

Nach der Empfindlichkeit im Schnelltest oder in den Dosiseffektkurven nach UV- oder Röntgenbestrahlung wurden die einzelnen Sporen den verschiedenen Genotypen zugeordnet. In Abb. 10a, b, c ist am Beispiel des Stammes S 2057 die Aufspaltung der Tetradensporen in die verschiedenen Genotypen an Hand der Inaktivierungskurven nach UV- und Röntgenbestrahlung dargestellt. Die Tetrade S 2057-3 ist ein Beispiel für einen parentalen Dityp, die Tetrade S 2057-6 zeigt einen Rekombinationsdityp und die Tetrade S 2057-9 den Tetratyp.

Von den meisten Tetraden wurden jedoch keine Dosiseffektkurven angefertigt, sondern die Strahlensensibilität im Schnelltest bestimmt. Zum Vergleich wurde jedoch von jeweils einer Tetrade jedes heterozygoten Stammes eine ausführliche Dosiseffektkurve angefertigt. Die gefundenen Strahlensensibilitätsunterschiede stimmten dabei völlig mit denen aus dem Schnelltest überein.

Eine Übersicht über die Tetradenanalyse der doppelt heterozygoten Diplonten gibt Tabelle II. Obwohl für jeden doppelt heterozygoten Diplonten wenigstens 20 Tetraden isoliert wurden, wurde die Analyse sehr erschwert, da nur wenig vollständige Tetraden mit vier vitalen Sporen aufwuchsen (s. Tabelle II). Um dennoch die Analyse zu ermöglichen, wurden

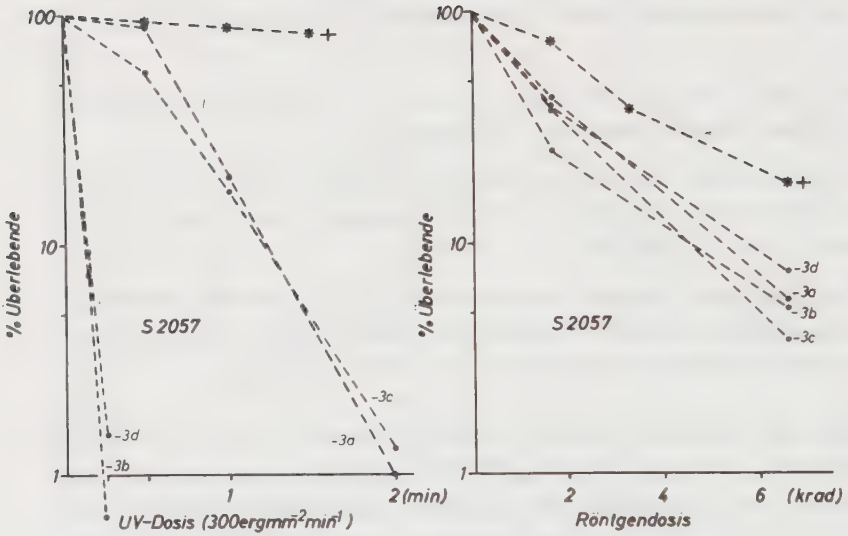

Abb. 10a - Parentaler Dityp: UV- und Rö-Dosiseffektkurven der haploiden Sporen S 2057-3a (r_2^s+), -3b (+r_{3-2}^s), -3c (r_2^s+) u. -3d (+r_{3-2}^s). Zum Vergleich Stamm 211-1aM (+) als Wildtyp.

daher auch Tetraden mit nur drei vitalen Sporen pro Askus verwendet. Manchmal ließ der Schnelltest keine eindeutige Bestimmung der Aufspaltungsverhältnisse zu. Z.B. sind die bei der Sporulation des (r_1^s+,+r_{3-2}^s)-Diplonten S 2052 auftretenden Sporen des Typs (+,r_{3-2}^s) nicht von Sporen des Typs (r_1^s,r_{3-2}^s) in ihrer Strahlenempfindlichkeit im Schnelltest zu unterscheiden.

Wenn man von Spezialfällen absieht, in denen abweichende Aufspaltungsverhältnisse auftreten können, treten nach ESSER u. KUENEN (1965) die drei Tetradentypen vorwiegend in bestimmten Verhältnissen auf. Diese Verhältniswerte er-

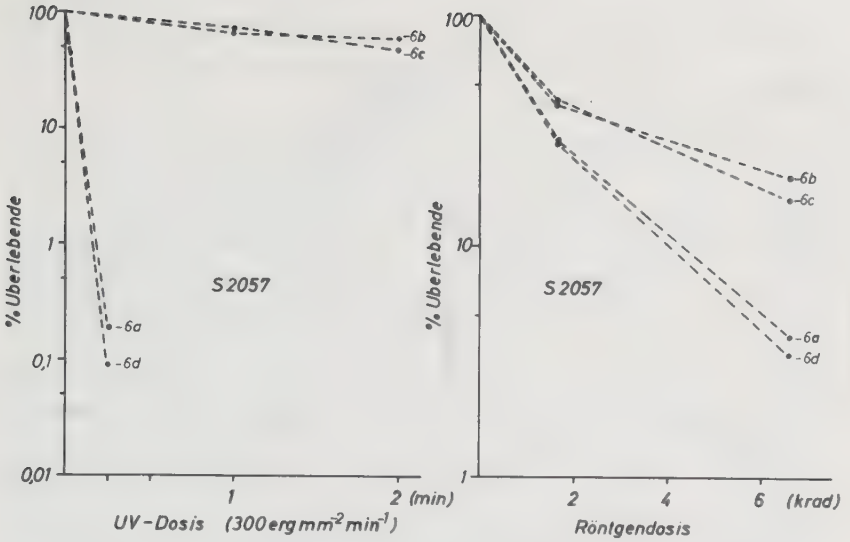

Abb. 10b - Rekombinationsdityp: UV- und Rö-Dosiseffekt-kurven der haploiden Sporen S 2057-6a ($r_2^s r_{3-2}^s$), -6b (++), -6c (++), - 6d ($r_2^s r_{3-2}^s$).

lauben Rückschlüsse auf die Lage der beteiligten Gene.

1. Segregation PD:RD:T = 1 : 1 : 4

   Deutung: Es liegen ungekoppelte Gene vor.

2. Segregation PD:RD:T = 1 : 1 :≤4

   Deutung: Zwei Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen. Davon rekombiniert mindestens eins relativ selten mit dem zugehörigen Centromer, ist also ein centromer-gekoppeltes Gen.

3. Segregation PD:RD:T = >1 : 1 :≤4

   Deutung: Zwei Gene liegen dicht zusammen auf demselben Chromosom, sind also eng gekoppelt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß gleiche

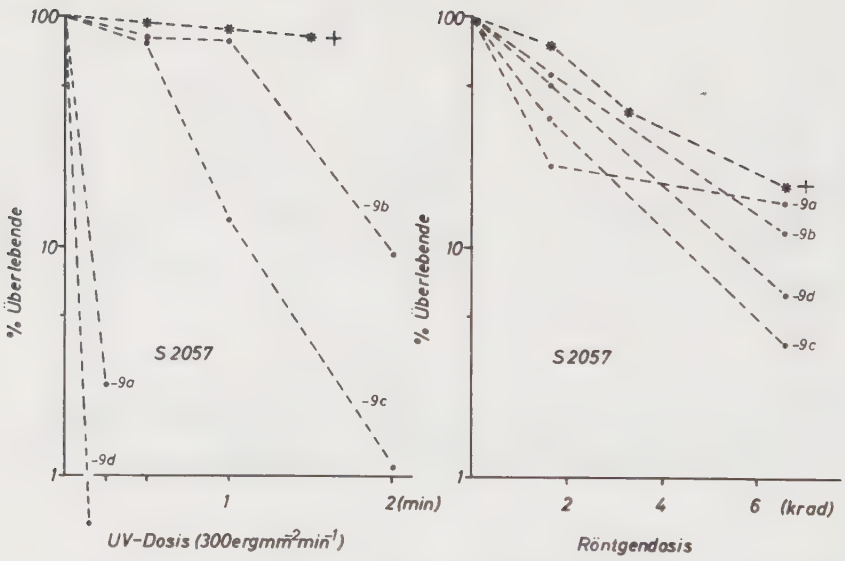

Abb. 10c - Tetratyp: UV- und Rö-Dosiseffektkurven der haploiden Sporen S 2057-9a ($+r^s_{3-2}$), -9b (++), -9c (r^s_2+), -9d ($r^s_2 r^s_{3-2}$). Wildtyp (+) zum Vergleich angegeben.

Deutung: Häufigkeiten auftreten, wenn zwei centromergekoppelte Gene vorliegen und die Centromere sich vorzugsweise in parentaler Kombination während der ersten Reifeteilung trennen.

Ein Vergleich der in Tabelle II angegebenen Segregationsverhältnisse mit diesen drei theoretisch zu erwartenden Fällen läßt darauf schließen, daß keine enge Kopplung zwischen den untersuchten Genen r^s_1, r^s_2 und r^s_3 besteht, da keine Aufspaltung im Sinne von Fall 3 auftritt. Da Parental- und Rekombinationsditypen (PD u. RD) vielmehr meistens

angenähert im Verhältnis 1:1 vorliegen, muß eine reine Zufallsverteilung ungekoppelter Gene (untereinander) während der Meiose (Fall 1 u. 2) angenommen werden.

Die Segregation PD:RD:T = 3 : 6 : 11 beim (r^s_1+,+r^s_2)-Diplonten S 2053 kann nach Fall 1 so gedeutet werden, daß die Gene r^s_1 und r^s_2 nicht eng gekoppelt sind, wobei nicht entschieden werden kann, ob diese Gene auf verschiedenen Chromosomen oder relativ weit von einander entfernt auf demselben Chromosom liegen.

Da bei den heterozygoten Diplonten, die jeweils eines der Gene r^s_1 oder r^s_2 zusammen mit einem der Allele r^s_{3-1} oder r^s_{3-2} enthalten (die Stämme S 2052, S 2056 und S 2057), Aufspaltungsverhältnisse auftreten (4:5:4, 4:4:7 bzw. 7:6:7), die einer Segregation nach Fall 2 (PD:RD:T = 1 : 1 :<4) etwa entsprechen, folgt, daß eines der beteiligten Gene centromer-gekoppelt ist. Da die Gene r^s_1 und r^s_2 im Hybriden S 2053 keine Kopplung zeigen, muß es das r^s_3-Gen sein, das an das zugehörige Centromer gekoppelt ist.

Da bei der Sporulation des (r^s_1+,+r^s_{3-1})-Diplonten S 2051 neben den strahlensensiblen Sporentypen (r^s_1+; +r^s_{3-1} bzw. $r^s_1 r^s_{3-1}$) auch Sporen des Typs (++) entsprechend dem Wildtyp auftreten, muß mindestens ein crossing-over zwischen den Genen r^s_1 und r^s_{3-1} stattgefunden haben. Dieser Befund ist vereinbar mit der Tatsache, daß zwischen den Genen r^s_1 und r^s_3 keine enge Kopplung vorliegt.

Bei der Sporulation von Zellen des Stammes S 2081c (r^s_{3-1} r^s_{3-2}), der heteroallelisch für die beiden Allele r^s_{3-1} und r^s_{3-2} ist, entstehen nur parentale Ditypen, d.h. alle Sporen einer Tetrade sind extrem strahlensensibel. Die Aufwuchsrate der Sporen ist allerdings sehr gering, sie beträgt nur 48 % gemessen an der Gesamtzahl der Sporen.

Zur Bestimmung des Abstandes der beiden Allele kann die Methode zur Bestimmung des Abstandes zweier Genmarken benutzt werden. Nach ESSER u. KUENEN (1965) läßt sich der Ab-

stand zweier Genmarken aus der Häufigkeit des Auftretens von Tetratypen abschätzen. Die halbe Tetratypfrequenz entspricht dabei dem ungefähren Abstand zweier genetischer Marken. Die zugehörige Kartierungsfunktion $t = 2x$ gilt jedoch nur bei totaler positiver Chromosomen-Interferenz. Die Bruchhäufigkeit ergibt sich dann zu $x = t/2$. Eine Kartierungseinheit (KE) entspricht dann der Bruchhäufigkeit ausgedrückt in Prozenten.

Ein Gen kann (nach ESSER u. KUENEN, 1965) die Dimension von etwa 1 KE erreichen. Nimmt man nun an, daß die beiden Allele jeweils terminal auf einem Gen (der Länge 1 KE) liegen, so wäre ein Tetratyp erst unter etwa 50 untersuchten Tetraden zu erwarten.

Eine formale Rechnung für die 13 Tetraden des Stammes S 2081c ergibt, da unter den Tetraden nicht ein Tetratyp gefunden wurde:

- eine Tetratypfrequenz t kleiner als $1/13 = 0{,}077$ und
- eine Bruchhäufigkeit x kleiner als $0{,}077/2 = 0{,}0375$.

Der Abstand der beiden Allele muß demnach geringer als 3,75 KE sein. Diese Angabe stellt nur einen sehr groben Schätzwert dar, da die Zahl der untersuchten Tetraden noch zu klein ist.

3.2.1.1. Vergleich der r^s-Gene mit den von COX u. PARRY (1968) und RESNICK (1969) identifizierten uvs-Genen

Da inzwischen eine größere Anzahl strahlensensibler Mutanten bei Saccharomyces bekannt geworden ist, (NAKAI u. MATSUMOTO, 1967; SNOW, 1967; COX u. PARRY, 1968; LASKOWSKI, LOCHMANN, JANNSEN u. FINK, 1968; LASKOWSKI u. AVERBECK, 1968; MOUSTACCHI, 1969; RESNICK, 1969) ist eine Zuordnung der isolierten Mutanten und die Frage nach der Identität der Gene von großem Interesse. Für eine Untersuchung standen Stämme mit den 22 verschiedenen uvs-Genen von COX u.

PARRY und 8 Stämme mit uvs, xs oder uxs-Genen von RESNICK zur Verfügung.[1)]

Mutanten mit ähnlicher Strahlenempfindlichkeit wie die Stämme 1930, S 15, S 13 u. S 14 wurden ausgewählt und mit geeigneten r^s-Sporenklonen von komplementärem Paarungstyp gekreuzt. Die diploiden Kreuzungsprodukte wurden im Schnelltest auf ihre UV-Sensibilität überprüft. Traten unter den Diplonten strahlenresistente Stämme auf (entsprechend Wildtypdiplonten), wurde das als ausreichender Nachweis für eine Komplementierung und damit für die Verschiedenartigkeit der zugrundeliegenden Gene angesehen.

Nichtkomplementierung, angezeigt durch strahlensensible diploide Kreuzungsprodukte, wurde bei folgenden Kreuzungen beobachtet:

uvs-2 (COX u. PARRY) x r^s_{3-1}
uvs-2 " " x r^s_{3-2}
uvs 9-2 (RESNICK) x r^s_{3-1}
uvs 9-2 " X r^s_{3-2}
uvs 9-3 " x r^s_{3-1}
uvs 9-3 " x r^s_{3-2}

Daraus geht hervor, daß die Mutationen in den mit dem Symbol uvs-9 und uvs-2 bezeichneten Genen mit denen im r^s_3-Gen allelisch sind, d.h., es handelt sich um Mutationen im gleichen Gen.

RESNICK hat für das Gen uvs-9 nachgewiesen, daß es mit dem von SNOW 1968 identifizierten centromer-gekoppelten uvr 9 Gen (SNOW, 1968) identisch ist. Somit sind unabhängig in vier verschiedenen Laboratorien Mutationen innerhalb des gleichen Gens isoliert worden, obwohl verschiedene Mutagene bei der Mutationsauslösung benutzt wurden (RESNICK, 1968: salpetrige Säure, COX u. PARRY, 1968: Äthylmethylsulfonat (EMS), SNOW, 1967: EMS, LASKOWSKI u. AVERBECK, 1968: (NNMG)

1) Für die Übersendung der Stämme sind wir den Herren Dr. COX und Dr. RESNICK zu Dank verpflichtet.

1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin).

3.2.1.2. Herstellung homozygoter Diplonten ($r^s r^s$)

Wie aus dem Stammbaum in Abb. 6 zu ersehen ist, führten Kreuzungen zwischen geeigneten sensiblen r^s-Sporenklonen komplementären Paarungstyps zu diploiden Stämmen, die homozygot für die r^s-Gene sind. Diese homozygoten Stämme, $r^s_2 r^s_2$ (S 2095), $r^s_{3-1} r^s_{3-1}$ (S 2093) und $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$ (S 2094), dienten als Grundlage für die Analyse der Wirkungen der r^s-Gene im homozygoten diploiden Zustand. Dabei wurde auch der $r^s_1 r^s_1$-Diplont 298 zum Vergleich herangezogen (LASKOWSKI et al., 1968).

Bei der Überprüfung der Sporenbildung stellte sich heraus, daß die homozygoten Stämme mit den Genotypen $r^s_1 r^s_1$, r^s_{3-1} r^s_{3-1} und $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$ keine Sporen mehr zu bilden in der Lage sind, obwohl der homozygote $r^s_2 r^s_2$-Diplont durchaus noch Sporen bilden kann (vgl. Übersichtstabelle III). Auch andere Autoren wie RESNICK (1968), COX u. PARRY (1968) und PUGLISI (1967) berichteten vom Fehlen der Sporulationsfähigkeit bei einigen strahlensensiblen Diplonten. Ähnliche Befunde sind von anderen Pilzen (Ustilago, Aspergillus, Neurospora) von HOLLIDAY (1967), LANIER, TUVESON u. LENNOX (1968) und CHANG u. TUVESON (1968) bei strahlensensiblen Stämmen berichtet worden.

Tabelle III

Übersicht über das Sporulationsverhalten der heterozygoten und homozygoten Diplonten

Genotyp	Bildung von Askosporen (A)			
	viel	wenig	fast keine	keine
++	A	-	-	-
r^s_1+	-	A	-	-
r^s_2+	A	-	-	-
r^s_{3-1}+	A	-	-	-

Genotyp	Bildung von Askosporen (A)			
	viel	wenig	fast keine	keine
$r^s_{3-2^+}$	A	-	-	-
$r^s_1 r^s_1$	-	-	-	A
$r^s_1 r^s_2$	-	-	A	-
$r^s_1 r^s_{3-1}$	-	-	A	-
$r^s_1 r^s_{3-2}$	-	-	A	-
$r^s_2 r^s_{3-1}$	A	-	-	-
$r^s_2 r^s_{3-2}$	A	-	-	-
$r^s_{3-1} r^s_{3-2}$	-	A	-	-
$r^s_2 r^s_2$	A	-	-	-
$r^s_{3-1} r^s_{3-1}$	-	-	-	A
$r^s_{3-2} r^s_{3-2}$	-	-	-	A

Ein Vergleich der Askenbildung bei heterozygoten und homozygoten Stämmen zeigt, daß alle Stämme, die das r^s_1-Gen enthalten, eine reduzierte Askosporenbildung aufweisen. Die homozygoten diploiden Stämme mit dem r^s_1-Gen oder den Allelen r^s_{3-1} oder r^s_{3-2} vermögen keine Asken mehr zu bilden. Beim $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$ Diplonten wurden jedoch unter bestimmten Bedingungen einige aberrante Asken gefunden. Beim heteroallelen Stamm S 2081c ($r^s_{3-1} r^s_{3-2}$) ist eine geringe Sporulation nachzuweisen. Die Gegenwart der Wildtyp-Allele in diesem Diplonten scheint eine reduzierte Bildung von Askosporen noch zu ermöglichen.

Ist das r^s_2-Gen, das in homozygotem Zustand (S 2095) für gute Sporulationsfähigkeit sorgt, zusammen mit dem r^s_{3-2}-Allel vorhanden wie z.B. im heterozygoten Diplonten S 2057, so läßt sich sehr gute Sporulation beobachten.

Das Merkmal, reduzierte Sporenbildung, scheint demnach rezessiv zu wirken, wenn es zusammen mit r^s_3-Allelen vorliegt. Es wirkt sich jedoch vermutlich dominant aus, wenn das r^s_1-Gen zugrundeliegt.

3.3. Charakterisierung der strahlensensiblen Stämme von Saccharomyces

3.3.1. Einführung

Die genetisch analysierten haploiden und entsprechenden diploiden Stämme (weitestgehend isogen und homozygot für die einzelnen r^s-Gene) bieten die Möglichkeit zur Untersuchung der Strahlensensibilität und des Reaktivierungsvermögens in Abhängigkeit von bestimmten Genotypen. Tabelle IV zeigt in einer Übersicht die verwendeten Stämme und Sporenkulturen, deren Reaktionen auf Einwirkung von UV- oder (teilweise auch) Röntgenstrahlen näher charakterisiert werden sollen.

Tabelle IV
Übersicht über die verwendeten Stämme

Haplonten		Diplonten	
Gensymbol	Stammbezeichnung	Gensymbol	Stammbezeichnung
+	211-1aM	+ +	2012
r_1^s [1]	1930, 289-2b	$r_1^s r_1^s$	298
r_2^s	S 15, S 25-13b,-13d	$r_2^s r_2^s$	S 2095
r_{3-1}^s	S 13, S 23-21b,-1c,-1d	$r_{3-1}^s r_{3-1}^s$	S 2093
r_{3-2}^s	S 14, S 24-12c,-12d	$r_{3-2}^s r_{3-2}^s$	S 2094
r_1^s, r_2^s	S 2053-1c	-	-
r_2^s, r_{3-1}^s	S 2056-7b	$r_2^s r_2^s, r_{3-1}^s r_{3-1}^s$	2101
r_2^s, r_{3-2}^s	S 2057-6a	$r_2^s r_2^s, r_{3-2}^s r_{3-2}^s$	2102
-	-	$r_{3-1}^s r_{3-2}^s$	S 2081c

1) Stämme mit dem r_1^s-Gen sind ausführlich beschrieben in LASKOWSKI et al.[1](1968).

3.3.2. Strahlenempfindlichkeit des Koloniebildungsvermögens der r^s-Stämme

In Abb. 11 sind die Überlebenskurven (bezogen auf das Koloniebildungsvermögen) nach Einwirkung von ultraviolettem Licht

für die haploiden Mutanten mit den Genen r^s_1, r^s_2, r^s_{3-1} und r^s_{3-2} und die entsprechenden homozygoten diploiden Stämme (verglichen jeweils mit den Wildtypen (+, ++) dargestellt.

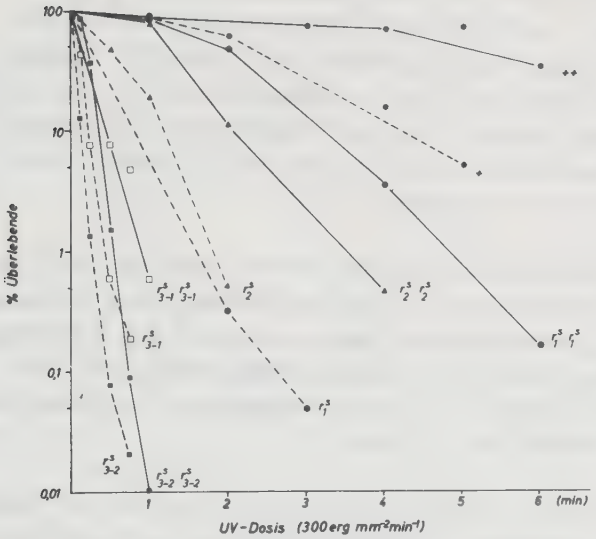

Abb. 11 - UV-Dosiseffektkurven der haploiden (gestrichelt) und homozygoten diploiden (ausgezogene Linien) strahlensensiblen Stämme und die Wildtyp-Stämme (+, ++). (Stammbezeichnungen s. Abb. 6).

Der haploide r^s_2-Stamm (S 15) besitzt wie der haploide r^s_1-Stamm (1930) eine mittlere Sensibilität gegenüber UV, während die haploiden r^s_{3-1}- und r^s_{3-2}-Mutanten extrem strahlenempfindlich sind im Vergleich zum Wildtyp (211-1aM).

Die zugehörigen homozygoten Diplonten sind im allgemeinen deutlich resistenter als die Haplonten. Demnach scheint also auch bei den r^s-Stämmen eine deutliche Abhängigkeit zwischen Ploidiegrad und Strahlenresistenz zu bestehen, wie

es bereits LATARJET u. EPHRUSSI(1949)bei Haplonten und Diplonten nachgewiesen haben. Das Verhältnis der Strahlenempfindlichkeit der Diplonten untereinander entspricht ungefähr dem der Haplonten untereinander.

Die Dosiseffektkurven für die Diplonten $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$ und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$ liegen tiefer als die Überlebenskurven für die Haplonten mittlerer UV-Sensibilität (r^s_1 und r^s_2). Demnach erreichen die Diplonten, die die Mutationen r^s_{3-1} und r^s_{3-2} enthalten, nicht einmal die Überlebenswahrscheinlichkeit von strahlensensiblen haploiden Stämmen (r^s_1 und r^s_2) bei gleicher UV-Bestrahlungsdosis.

Bei allen Dosiseffektkurven nach UV-Bestrahlung läßt sich deutlich ein Schulterbereich von dem Bereich mit exponentiellem Verlauf unterscheiden. Wenn die Skala für die eingestrahlte UV-Dosis etwa 5 - 6fach gedehnt wird, ist ein kleiner Schulterbereich auch bei Stämmen mit extremer Sensibilität festzustellen (s. Abb. 15).

Dennoch darf nicht übersehen werden, daß die bei den Wildtypstämmen so ausgeprägte Schulter bei den empfindlichen Stämmen stark reduziert ist.

Wie aus Abb. 12 zu ersehen ist, unterscheidet sich die Verteilung der relativen Empfindlichkeiten gegenüber Röntgenstrahlen grundsätzlich von der gegenüber UV-Bestrahlung. Die strahlensensiblen Haplonten r^s_1, r^s_2, r^s_{3-1} und r^s_{3-2} heben sich zwar deutlich in ihrer Empfindlichkeit von der des Wildtyphaplonten (+) ab (DRF:2), liegen jedoch alle im etwa gleichen Sensibilitätsbereich.

Bei dieser Sensibilitätsverteilung der haploiden Stämme wäre analog zu den Ergebnissen nach UV-Bestrahlung zu erwarten, daß die Dosiseffektkurven für die entsprechenden homozygoten diploiden r^s-Stämme gleichfalls eng beieinander liegen. Wie jedoch in Abb. 12 dargestellt, ergibt sich für die Sensibilität der einzelnen Diplonten ein völlig anderes Bild.

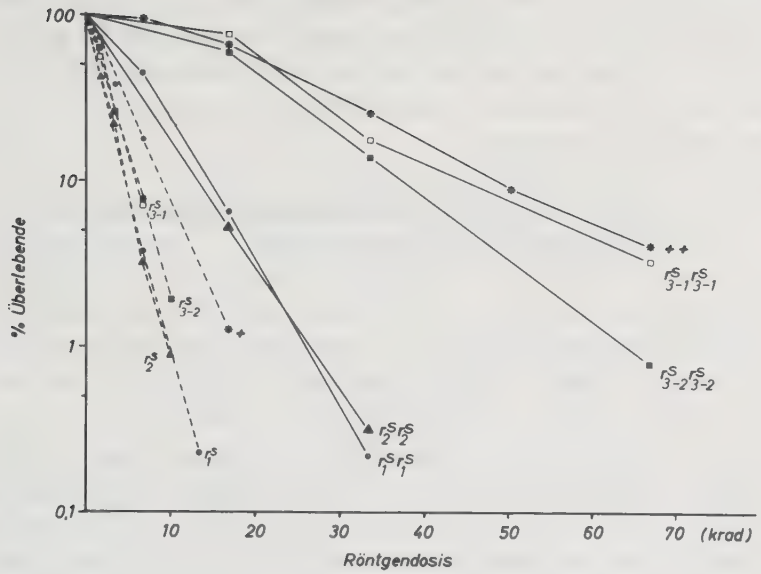

Abb. 12 - Röntgendosiseffektkurven für die haploiden (gestrichelt) und homozygoten diploiden (ausgezogene Linien) strahlensensiblen Stämme und die Wildtyp-Stämme (+, ++). (Stammbezeichnungen s. Abb. 6).

Während der $r^s_2r^s_2$-Diplont (S 2095) wie der $r^s_1r^s_1$-Diplont (298) deutlich eine mittlere Röntgensensibilität (Dosisreduktionsfaktor: 3,4) besitzt, sind die homozygoten Diplonten mit dem r^s_{3-1}- und r^s_{3-2}-Allel etwa genauso resistent gegen Röntgenstrahlen wie der zugehörige Wildtyp-Diplont ++ (2012). (Der $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$-Diplont (S 2094) ist nur wenig sensibler als der Wildtyp-Diplont (Dosisreduktionsfaktor: 1,3).

Da im Gegensatz zu den Überlebenskurven der haploiden Stämme die Dosiseffektkurven der homozygoten Diplonten nach Röntgenbestrahlung eine deutliche Schulter haben und

die Röntgensensibilität bei den Diplonten andersartig gestuft ist als bei den r^s-Haplonten, ist zu vermuten, daß es sich bei der Abtötung haploider und diploider Zellen offensichtlich um eine Induktion verschiedener Schäden und/oder um verschiedene Reparaturmechanismen in Haplonten und Diplonten handelt.

3.3.3. Einfluß verschiedener r^s-Gene auf die Strahlensensibilität von Doppelmutanten

Haploide Sporenklone, die gleichzeitig zwei verschiedene mutierte r^s-Gene enthalten, konnten nach der Sporulation der heterozygoten diploiden Stämme (r^s_x+,+r^s_y) aus den Tetraden vom Rekombinationsdityp (RD) oder Tetratyp (T) isoliert werden (s. 3.2.1.). Die Identifizierung dieser "doppelt sensiblen" Stämme erfolgte ausschließlich aufgrund der Strahlensensibilität und der entsprechenden Spaltungsverhältnisse innerhalb der Tetraden (RD u. T). Auf eine genaue genetische Analyse (Einkreuzen in einen haploiden Wildtyp und Tetradenanalyse der Kreuzungsprodukte) wurde angesichts der phänotypisch gut abgesicherten Befunde aus der Tetradenanalyse der heterozygoten Diplonten verzichtet.

Eine genauere Überprüfung der Strahlensensibilität der Stämme, die die vier r^s-Mutationen (r^s_1, r^s_2, r^s_{3-1} u. r^s_{3-2}) in insgesamt fünf möglichen Kombinationen enthalten (die Kombination $r^s_{3-1}r^s_{3-2}$ wurde nicht untersucht), ergab, daß alle "doppelt sensiblen" Haplonten extrem UV-empfindlich sind.

Haploide Sporen des Typs r^s_1,r^s_2 erweisen sich im Schnelltest als wesentlich UV-sensibler als Haplonten mit dem r^s_1 oder r^s_2-Gen allein, Sporen des Typs r^s_1,r^s_{3-1} oder r^s_1,r^s_{3-2} sind mindestens so UV-empfindlich wie die Sporen mit den Einzelmutationen r^s_{3-1} und r^s_{3-2}.

In Dosiseffektkurven für die Haplonten r^s_2,r^s_{3-1} und r^s_2,r^s_{3-2} konnte gezeigt werden, daß sie noch UV-empfindlicher als

die haploiden Stämme r^s_{3-1} und r^s_{3-2} sind. Tabelle V gibt eine Aufstellung der Dosisreduktionsfaktoren (DRF) für die haploiden r^s-Einzel- und Doppelmutanten. Die DRF sind jeweils bestimmt für 1 % Überlebende und entsprechen dem Quotienten LD_1(Wildtyp):LD_1(Mutante).

Tabelle V

Dosisreduktionsfaktoren für die haploiden r^s-Einzel- und Doppelmutanten

Genotyp	DRF UV	DRF Rö
+	1,0	1,0
r^s_1	4,0	1,6
r^s_2	2,8	1,6
r^s_{3-1}	16,0	1,3
r^s_{3-2}	21,5	1,3
r^s_1, r^s_2	> 4,0	?
r^s_2, r^s_{3-1}	23,2	1,6
r^s_2, r^s_{3-2}	43,0	1,6

Aus Tabelle V ist zu entnehmen, daß die Doppelmutante r^s_2, r^s_{3-2} genau doppelt so UV-empfindlich ist wie die Einzelmutante r^s_{3-2}. Die Doppelmutante r^s_2, r^s_{3-1} ist jedoch nur etwa 1 1/2mal so sensibel wie der r^s_{3-1}-Haplont.

Gegenüber UV-Bestrahlung läßt sich demnach bei den haploiden Doppelmutanten r^s_1, r^s_2; r^s_2, r^s_{3-1} und r^s_2, r^s_{3-2} eine deutliche Additivität der Effekte der Einzelmutationen feststellen. Für die Doppelmutanten r^s_1, r^s_{3-1} und r^s_1, r^s_{3-2} konnte zwar im Schnelltest eine extreme UV-Sensibilität (entsprechend mindestens den Einzelmutanten r^s_{3-1} oder r^s_{3-2}) nachgewiesen werden, aber genauere Aussagen über die vermutliche Additivität der Mutationen r^s_1 und r^s_{3-1} od. r^s_{3-2} sind erst möglich, wenn gesicherte UV-Dosiseffektkurven vorliegen.

Die Additivität bei den Doppelmutanten gilt nicht in gleicher Weise gegenüber Röntgenstrahlen. Die Doppelmutanten r^s_2,r^s_{3-1} und r^s_2,r^s_{3-2} zeigen gegenüber Röntgenstrahlen etwa die gleiche Sensibilität wie die r^s-Einzelmutanten (r^s_2,r^s_{3-1} und r^s_{3-2}). Aus Kreuzungen geeigneter "doppelt sensibler" Sporen (z.B. r^s_2,r^s_{3-1} X r^s_2,r^s_{3-1} oder r^s_2,r^s_{3-2} X r^s_2,r^s_{3-2}), die jeweils aus Tetraden vom Rekombinationsdityp gewonnen werden konnten, gingen zwei Diplonten S 2101 und S 2102 hervor, die jeder homozygot für zwei r^s-Mutationen sind. In Dosiseffektkurven wurde ermittelt, wie sich die Doppelmutationen in Diplonten auswirken. In Tabelle VI sind die Dosisreduktionsfaktoren (jeweils bestimmt für 10 % Überlebende, LD_{10} (Wildtyp) : LD_{10} (Mutante)) nach UV- und Röntgenbestrahlung für die Diplonten mit den r^s-Genen angegeben.

Tabelle VI

Dosisreduktionsfaktoren für die diploiden r^s-Einzel- und Doppelmutanten

Genotyp	DRF UV	DRF Rö	Stammbezeichnung
+ +	1,0	1,0	2012
$r^s_1r^s_1$	3,0	3,4	298
$r^s_2r^s_2$	4,7	3,7	S 2095
$r^s_{3-1}r^s_{3-1}$	21,4	1,0	S 2093
$r^s_{3-2}r^s_{3-2}$	26,4	1,3	S 2094
$r^s_{3-1}r^s_{3-2}$	35,5	1,0	S 2081c
$r^s_2r^s_2,r^s_{3-1}r^s_{3-1}$	23,6	4,0	S 2101
$r^s_2r^s_2,r^s_{3-2}r^s_{3-2}$	41,3	5,0	S 2102

Daraus ist zu ersehen, daß der doppelt homozygote Stamm S 2101 ($r^s_2r^s_2,r^s_{3-1}r^s_{3-1}$) etwas UV-empfindlicher als der homozygote Stamm $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$ ist, daß jedoch die UV-Sensibilität des doppelt homozygoten Stammes S 2102 im Vergleich

zum homozygoten Stamm $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$ erheblich gesteigert ist. Wie schon in den "doppelt sensiblen" haploiden Stämmen bewirkt das r^s_{2-}Gen in den diploiden Doppelmutanten eine weitere Verstärkung der UV-Sensibilität.

Gegenüber Röntgenbestrahlung erweisen sich die "doppelt sensiblen" homozygoten Diplonten S 2101 und S 2102 als etwas sensibler als die Rö-sensiblen homozygoten Diplonten $r^s_1r^s_1$ und $r^s_2r^s_2$. Auch gegenüber Röntgenbestrahlung beruht die Sensibilität hauptsächlich auf dem mutierten Gen r^s_2 in der homozygoten Form, die Gegenwart des mutierten Gens r^s_{3-1} oder r^s_{3-2} wirkt sich nur gering verstärkend aus.

Der heteroallele diploide Stamm $r^s_{3-1}r^s_{3-2}$ (S 2081c) ist UV-empfindlicher (DRF: 35,5) als die entsprechenden homozygoten Diplonten $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$ und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$. Gegenüber Röntgenbestrahlung ist der heteroallele Diplont genauso resistent wie der Wildtypdiplont.

3.3.4. Reaktivierungsvermögen der r^s-Stämme nach UV-Bestrahlung

3.3.4.1. Dunkelreaktivierung durch Agar-Haltung

Seit den umfassenden Untersuchungen von PATRICK, HAYNES u. URETZ (1964) ist bekannt, daß sich die Anzahl der Überlebenden nach UV-Bestrahlung bei Saccharomyces-Zellen wesentlich steigern läßt, wenn die Zeit zwischen Bestrahlung und erster Replikation der DNS verlängert wird, indem die bestrahlten Zellen zeitlich verzögert ausgeplattet werden (sog. delayed plating).

Bei Bakterien (E. coli) konnten GANESAN u. SMITH (1968 u. 1969) zeigen, daß die nach verzögerter Ausplattung, z.B. durch Haltung in Puffer ("Liquid Holding"), bei bestrahlten Bakterien zu beobachtende Erhöhung der Überlebensrate auf ein wirksames Excision-Repair-System zurückgeführt wer-

den kann, da Bakterienmutanten, die ein defektes Excision-Repair-System aufweisen, im allgemeinen keine oder nur eine geringe "Liquid-Holding-Recovery" zeigen. Es erschien daher interessant, den Einfluß der r^s-Mutationen auf die Koloniebildung nach verzögerter Ausplattung zu untersuchen.

Für die Bestimmung der Überlebensfähigkeit in den bisher geschilderten Versuchen wurden die haploiden und homozygoten diploiden Stämme mit den r^s-Genen sofort nach der Bestrahlung mit UV- oder Röntgenstrahlen auf Nährmedium ausgeplattet. Bei dieser Behandlung steht den Zellen jeweils nur eine Zeit von etwa 2 - 8 Stunden bis zur ersten DNS-Replikation zur Verfügung. Die unterschiedliche Sensibilität der r^s-Stämme im Vergleich zum Wildtyp mag darauf beruhen, daß diese Stämme unterschiedlich in der Lage sind, diese verhältnismäßig kurze Zeit für eine Reparatur von gesetzten Strahlenschäden in den Zellen zu nutzen. Wie verhalten sie sich aber gegenüber langfristigen Verzögerungen der Zellvermehrung?

Zur Überprüfung der langfristigen Reaktivierungsfähigkeit der r^s-Stämme wurde die Zeit zwischen Bestrahlung und erster DNS-Replikation wesentlich verlängert, indem die bestrahlten Zellen eine Zeit lang auf reinem Agar gehalten wurden, bevor sie mit Nährmedium überschichtet wurden und mit den Zellteilungen beginnen konnten. In UV-bestrahlten Hefezellen mit ungestörtem Reaktivierungsvermögen (z.B. Wildtyp) wird nach 48 Stunden Agar-Haltung (AH) maximale Agar-Haltung-Reaktivierung (AHR), d.h. ein maximales Überlebensplateau erreicht. Das Ausmaß der Erhöhung der Überlebensrate nach AHR entspricht im allgemeinen der Steigerung der Anzahl der Überlebenden, die durch Liquid Holding Recovery erreicht werden kann.

3.3.4.1.1. Fähigkeit zur Reaktivierung während der Agar-Haltung (AHR) bei haploiden r^s-Stämmen

Von den haploiden r^s-Stämmen und dem Wildtyp wurden jeweils

nach UV-Bestrahlung die Überlebensraten sowohl nach sofortigem Ausplatten als auch nach einer 48-stündigen Periode der Agar-Haltung bei 30°C bestimmt. Die entsprechenden Dosiseffektkurven mit und ohne AHR sind in Abb. 13, 14 und 15 dargestellt. Für r_1^s-Zellen wurde das Dunkelreaktivierungsvermögen (AHR) schon an anderer Stelle beschrieben (LASKOWSKI et al., 1968).

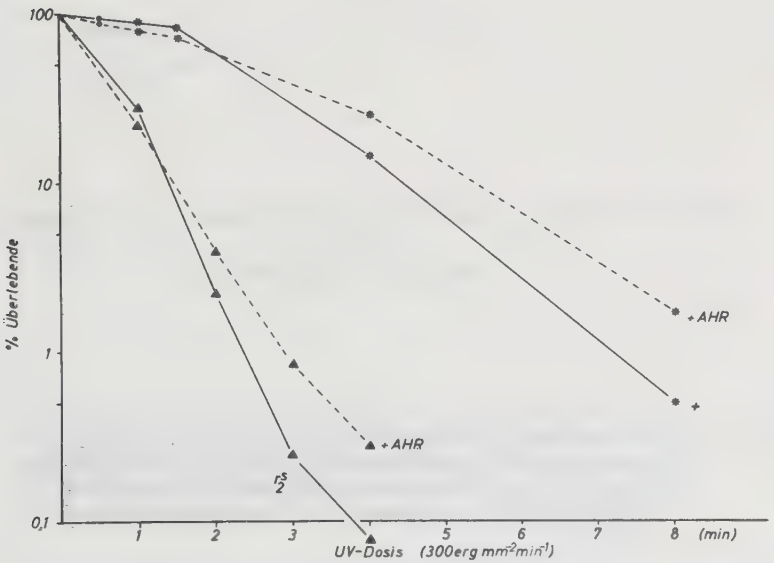

Abb. 13 - UV-Dosiseffektkurven des haploiden Wildtyp-Stammes 211-1aM (+) und des strahlensensiblen r_2^s-Stammes S 25-13b nach sofortigem Ausplatten nach Bestrahlung (ausgezogene Linien) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR, gestrichelte Kurven).

Aus den Abbildungen ist zu ersehen, daß r_2^s und r_{3-1}^s-Zellen (wie auch r_1^s-Zellen) ein Reaktivierungsvermögen besitzen, das dem des Wildtyp-Haplonten, bei gleicher Überlebensrate betrachtet, durchaus vergleichbar ist. Besonders deutlich

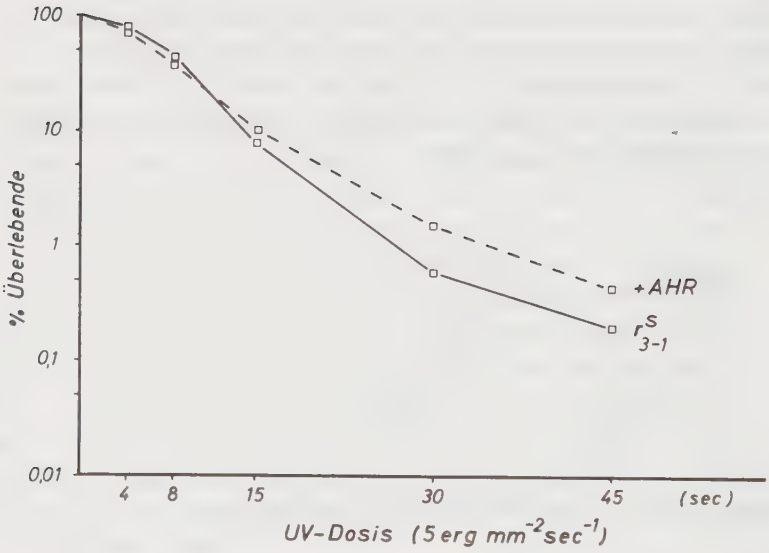

Abb. 14 - UV-Dosiseffektkurven des haploiden strahlensensiblen r^s_{3-1}-Stammes (S 13) nach sofortigem Ausplatten (ausgezogene Kurve) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR, gestrichelte Kurve).

tritt die AHR in den Bereichen mit Überlebensraten kleiner als 10 % Überlebende in Erscheinung, während in Bereichen geringer Abtötung sogar eine gewisse negative AHR zu beobachten ist.

In Erwartung höherer Inaktivierungsraten in höheren Dosisbereichen wurden in Abhängigkeit von der verwendeten UV-Dosis Suspensionen mit einem Zelltiter von 3×10^2 bis 3×10^6 pro 0,1 ml Puffer bestrahlt und auf den Agar aufgebracht. Die Zellen liegen also, wenn höhere UV-Dosen angewandt werden, wesentlich dichter auf der Agaroberfläche als bei Verwendung kleiner UV-Dosen.

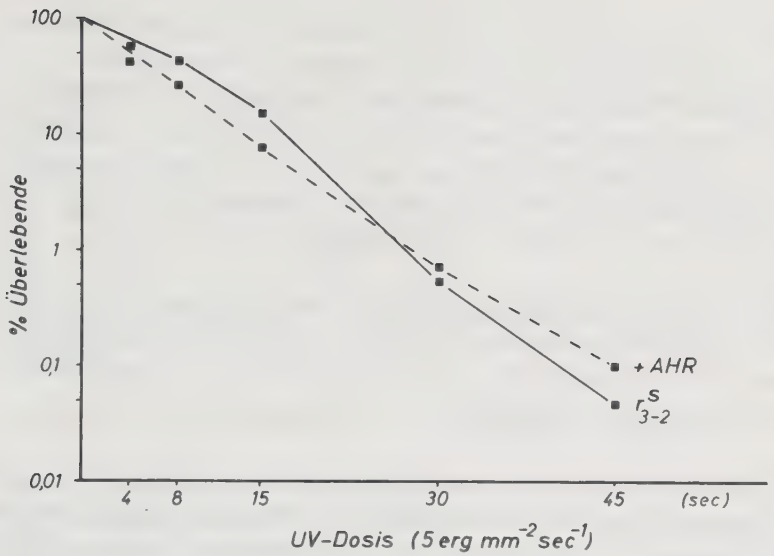

Abb. 15 - UV-Dosiseffektkurven des haploiden strahlensensiblen r^s_{3-2}-Stammes (S 24-12c) nach dem sofortigen Ausplatten (ausgezogene Kurve) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR, gestrichelte Kurve).

In früheren Untersuchungen zeigte sich bei Wildtyp- und r^s_1-Zellen eine deutliche Erhöhung durch AHR auch bei geringen Inaktivierungsraten in niedrigen UV-Dosisbereichen (LASKOWSKI et al., 1968). Möglicherweise lassen sich diese Ergebnisse auf methodische Unterschiede bei der Durchführung der Versuche zurückführen: die damaligen Experimente wurden in wenig gedämpftem Tageslicht oder im Licht von Leuchtstoffröhren durchgeführt, so daß Photoreaktivierung nicht ganz ausgeschlossen werden konnte. Die vorliegenden Versuche zur AHR wurden dagegen unter standartisierten Bedingungen bei stark gedämpftem Licht einer gelb-grünlichen Lampe geringer Intensität durchgeführt, d.h. unter Ausschluß

von gleichzeitiger PhR.

Deutlich reduziert erscheint die AHR nach UV-Bestrahlung in r^s_{3-2}-Zellen (Abb. 15). In höheren Dosisbereichen (150-225 erg mm^{-2}) läßt sich zwar eine gewisse Erhöhung der Überlebensrate durch AHR feststellen, aber im Vergleich zu dem AHR-Vermögen der r^s_2-, r^s_{3-1}- und Wildtypzellen (Abb. 13, 14) ausgehend vom gleichen Überlebensniveau ist die AHR der r^s_{3-2}-Zellen erheblich gemindert.

Das unterschiedliche AHR-Vermögen der r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Zellen ist offensichtlich genetisch verankert und läßt sich nicht durch eine unterschiedliche Abtötungsrate bei unbestrahlten Kontrollen erklären.

Die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen, die bis auf die Bestrahlung gleichartig behandelt worden sind, wird während 48 Stunden der Agar-Haltung nicht wesentlich verändert. Die Überlebensrate beträgt für r^s_2, r^s_{3-1}, r^s_{3-2} und Wildtyp-Zellen nach 48 Stunden AHR einheitlich 80 - 90 % Überlebende. Die einzelnen Überlebensraten für die bestrahlten Zellen werden jeweils auf unbestrahlte, aber sonst gleichartig behandelte Kontrollen bezogen.

Da r^s_{3-1}-und r^s_{3-2}-Zellen in gleicher Weise extrem UV-empfindlich sind, wenn sie sofort nach Bestrahlung ausgeplattet werden, ist das unterschiedliche Verhalten bei der AHR besonders bemerkenswert. Eine Erklärung dafür ist möglich, wenn man annimmt, daß im r^s_{3-2}-Stamm spontan eine zweite Mutation aufgetreten ist, die gleichzeitig auch den Verlust des AHR-Vermögens zur Folge hat.

Läge tatsächlich eine solche zusätzliche Mutation vor, müßten unter den strahlensensiblen Sporenklonen, die bei der Sporulation des Hybridstammes (r^s_{3-2}+) S 24 gewonnen wurden, auch Sporen auftreten, die zwar extrem UV-sensibel sind (r^s_{3-2}-Sporen), aber das AHR-Vermögen des Wildtyps besitzen. Vier verschiedene r^s_{3-2}-Sporen (S 24-12c u. d,

S 24-14b u. d) wurden daraufhin getestet. Da in keiner der vier extrem UV-sensiblen Sporen eine normale AHR wie im Wildtyp nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, daß entweder das r^s_{3-2}-Allel für die extreme UV-Sensibilität und den Verlust der normalen AHR-Fähigkeit tatsächlich verantwortlich ist, oder aber eine zusätzliche Mutation vorhanden ist, die allerdings mit der r^s_{3-2}-Mutation relativ eng gekoppelt sein muß und den Verlust der AHR-Fähigkeit bewirkt. Aus der ersteren Annahme, die wohl als die wahrscheinlichere gelten darf, folgt, daß das Ausmaß der Reduktion der AHR-Fähigkeit als Folge einer Mutation im r^s_3-Gen abhängig vom Mutationsort ist.

3.3.4.1.2. AHR-Vermögen bei homozygoten r^s-Diplonten

Abb. 16 zeigt die UV-Dosiseffektkurven für den homozygoten Wildtyp-Diplonten ++ (2012) und den homozygoten Stamm $r^s_2 r^s_2$ (S 2095) nach dem sofortigen Ausplatten auf Nähragar und nach 48 Stunden Haltung auf reinem Agar. Wie ein Vergleich der Überlebenskurven erkennen läßt, wird die Überlebensrate nach UV durch AHR beim $r^s_2 r^s_2$-Diplonten wirksamer gesteigert als es beim homozygoten Wildtyp der Fall ist, obwohl haploide r^s_2-Zellen und haploide Wildtyp-Zellen das gleiche Vermögen zur AHR besitzen. Das mutierte Gen r^s_2 führt demnach in diploidem Zustand zu einer besseren AHR-Fähigkeit als das unmutierte Wildtyp-Gen.

Der bemerkenswerte Unterschied in der AHR der haploiden r^s_{3-1}- und r^s_{3-2}-Zellen ist noch ausgeprägter bei den homozygoten Diplonten zu finden. Während UV-bestrahlte r^s_{3-1} r^s_{3-1}-Zellen (Abb. 17) eine gute Reaktivierbarkeit zeigen, die etwa der des Wildtyp-Diplonten entspricht (Abb. 16), ist das AHR-Vermögen in $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$-Zellen fast vollständig reduziert (Abb. 18), wenn man ausgehend von einem bestimmten Überlebensniveau jeweils die durch AHR veränderte Überlebensfähigkeit betrachtet. Erst in höheren Dosisbereichen (über 300 erg mm^{-2}) bei stärkerer Inaktivierungsrate ist eine AHR zu beobachten.

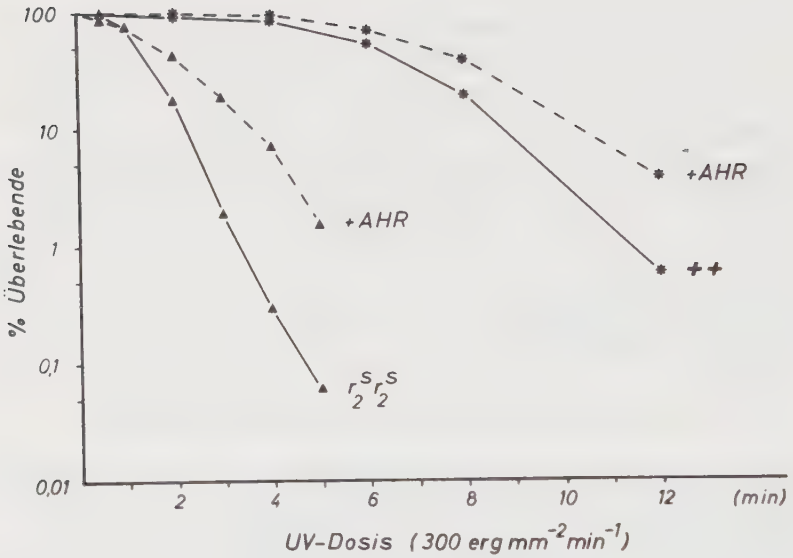

Abb. 16 - UV-Dosiseffektkurven für den homozygoten Wildtyp-Diplonten (++) und den $r_2^s r_2^s$-Diplonten nach sofortigem Ausplatten (ausgezogene Kurven) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR, gestrichelte Kurven). Werte für den $r_2^s r_2^s$-Diplonten aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Das r^s_{3-2}-Allel führt nicht nur in haploiden, sondern auch in homozygoten diploiden Zellen zu einem fast vollständigen Verlust des AHR-Vermögens.

Einen guten Überblick über das unterschiedliche AHR-Vermögen in den Haplonten und homozygoten Diplonten gibt die folgende Tabelle VII an Hand der Aufstellung der AHR-Dosismodifikationsfaktoren, die jeweils aus dem Verhältnis der nach AHR gefundenen LD_1 (Letal-Dosis für 1 % Überlebende) zur LD_1 (ohne AHR) bestimmt wurden (Werte aus den Dosiseffektkurven).

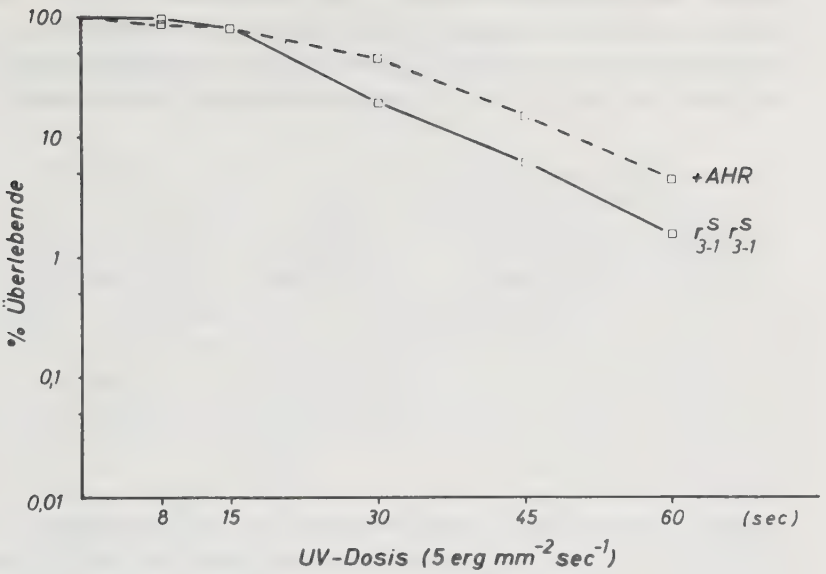

Abb. 17 - UV-Dosiseffektkurven für den homozygoten r^s_{3-1} r^s_{3-1}-Diplonten (S 2093) nach dem sofortigen Ausplatten (ausgezogene Kurve) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (gestrichelte Kurve, + AHR). Werte sind aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Tabelle VII

Dosismodifikation durch AHR

Gen-Symbol	Dosismodifikationsfaktoren für UV (LD_1+AHR/LD_1)	
	Haplonten	Diplonten
+	1,23	1,24
r^s_1	1,44 [1]	1,63 [1]
r^s_2	1,22	1,52
r^s_{3-1}	1,29	1,23
r^s_{3-2}	1,03	0,94

[1] siehe S. 72

1) Die Dosismodifikationsfaktoren wurden nach Dosiseffektkurven von LASKOWSKI et al. (1968) bestimmt. Für die hohen Werte sind vermutlich methodische Unterschiede verantwortlich, da eine zusätzliche Photoreaktivierung bei den Experimenten nicht ausgeschlossen werden kann.

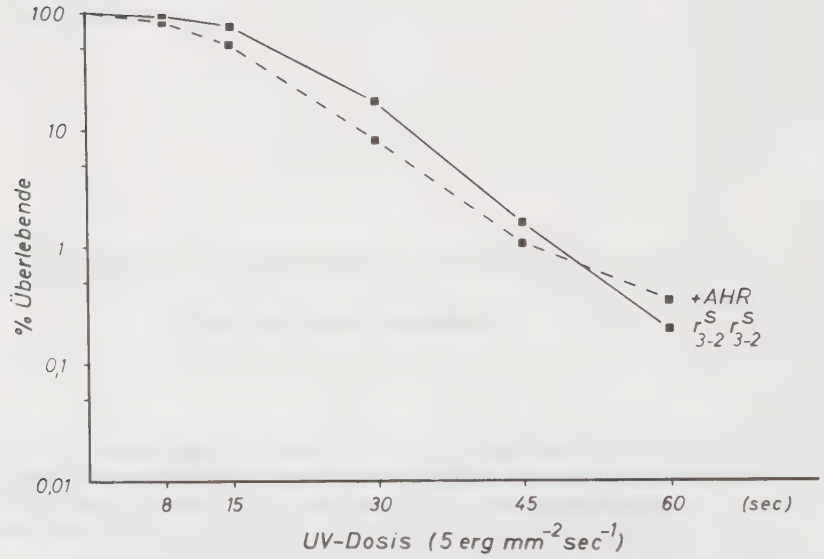

Abb. 18 - UV-Dosiseffektkurven für den homozygoten $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$-Diplonten (S 2094) nach dem sofortigen Ausplatten (ausgezogene Kurve) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (gestrichelte Kurve, + AHR). Werte aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Die Dosismodifikationsfaktoren (DMF) durch AHR verdeutlichen noch einmal die Reaktivierungsfähigkeit der einzelnen Stämme. Haploide und homozygote diploide Stämme mit dem r^s_{3-1}-Allel besitzen etwa das gleiche AHR-Vermögen wie

die Stämme mit dem Wildtyp-Gen. Die DMF 1,29 und 1,23 sowie 1,23 und 1,24 sind fast identisch. Die DMF von 1,03 und 0,94 für die Stämme mit dem r^s_{3-2}-Allel belegen die fast völlige Reduktion der AHR-Fähigkeit in diesen Stämmen bei 1 % Überlebenden.

Die DMF der homozygoten Diplonten $r^s_1 r^s_1$ und $r^s_2 r^s_2$ liegen höher als die DMF der entsprechenden Haplonten. Diese DMF sind mit den aus der Literatur bekannten Werten für die Dunkelreaktivierung vergleichbar. Nach PATRICK, HAYNES u. URETZ (1964) ergeben sich für einen Haplonten (S C 7) je nach Überlebensrate DMF von 1,18 - 1,3, für einen Diplonten (S C 6) DMF von 1,4 - 1,8. PARRY u. PARRY (1969) gaben kürzlich für einen Haplonten (nach 8 Tagen Puffer-Haltung) einen DMF von 1,15 an.

Die unterschiedlichen DMF sind wahrscheinlich auf methodische Unterschiede zurückzuführen, vielleicht aber auch darauf, daß die DMF (z.B. bei Haplonten) an verschiedenen Überlebensbereichen im exponentiellen Teil der Dosiseffektkurven gemessen werden. PATRICK, HAYNES u. URETZ (1964) haben bereits schon darauf hingewiesen, daß sich für Haplonten kein konstanter DMF bei verschiedenen Überlebensbereichen ermitteln läßt (im Gegensatz zu den Diplonten). Es erscheint deshalb sinnvoll, die DMF immer auf ein bestimmtes Überlebensniveau zu beziehen, um die DMF wirklich vergleichen zu können.

An dieser Stelle sei kurz vermerkt, daß ein gutes AHR-Vermögen für die homozygoten Diplonten $r^s_1 r^s_1$ (298), $r^s_2 r^s_2$ (S 2095), $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$ (S 2094) und den Wildtyp nach Röntgenbestrahlung nachgewiesen werden konnte ($r^s_{3-1} r^s_{3-1}$-Diplonten wurden nicht überprüft). Die beobachteten DMF liegen jeweils bei 2,0 - 2,5 und entsprechen damit den von PATRICK, HAYNES u. URETZ (1964) für die Dunkelreaktivierung angegebenen Werten (DMF: 2,0).

3.3.4.1.3. Negativer AHR-Effekt

Allgemein läßt sich bei allen Überlebenskurven, die nach sofortigem Ausplatten nach UV-Bestrahlung oder nach Bestrahlung mit zusätzlicher AHR gewonnen wurden, in einem bestimmten Dosisbereich feststellen, daß bei fast allen haploiden und diploiden r^s- und Wildtyp-Stämmen (einzige Ausnahme ist der homozygote Wildtyp-Diplont) die AHR-Behandlung nach UV-Bestrahlung einen zusätzlichen negativen Effekt hat. Die Schnittpunkte der UV-Inaktivierungskurven mit den entsprechenden Reaktivierungskurven (Abb. 13 - 18) liegen für die einzelnen Stämme recht verschieden (s. Tabelle VIII).

Tabelle VIII

Schnittpunkte der UV-Inaktivierungskurven mit den entsprechenden AHR-Kurven

Haplonten

Genotyp	Überlebensrate	UV-Dosis (erg/mm^2)
+	58 %	600
r^s_2	14 %	375
r^s_{3-1}	21 %	55
r^s_{3-2}	1,4 %	130

Diplonten

Genotyp	Überlebensrate	UV-Dosis (erg/mm^2)
++	-	-
$r^s_2 r^s_2$	75 %	225
$r^s_{3-1} r^s_{3-1}$	80 %	75
$r^s_{3-2} r^s_{3-2}$	0,65 %	256

Die angegebenen Punkte der Überschneidung sind hier für typische Versuche bestimmt, im Einzelfall können die Schnittpunktsbereiche ein wenig differieren, der bezeichnete Dosisbereich, in dem sich die Kurven überschneiden, bleibt jedoch weitgehend erhalten.

Wie aus den Werten aus Tabelle VIII zu ersehen ist, kann eine positive AHR bei den verschiedenen Stämmen erst nach Einwirkung einer bestimmten UV-Dosis beobachtet werden.

Während beim haploiden Wildtyp-Stamm bis zu einer UV-Dosis von 600 erg/mm^2 ein negativer AHR-Effekt zu erkennen ist, erscheint der Dosisbereich, in dem negative AHR zu beobachten ist, bei den UV-sensiblen Stämmen wesentlich reduziert. Schon nach Empfang einer verhältnismäßig geringen UV-Dosis (55, 130 und 375 erg/mm^2) wird der Schwellenwert erreicht, von dem an eine positive AHR bei den haploiden Stämmen r^s_{3-1}, r^s_{3-2} und r^s_2 mit steigender UV-Dosis einsetzt. Die einzelnen Schwellenwerte für die entsprechenden Diplonten liegen etwas höher.

Der negative AHR-Effekt ist jedoch in allen Fällen, gemessen an der Erniedrigung der Überlebensrate, nicht besonders ausgeprägt. Am deutlichsten ist dieser negative Effekt bei dem UV-sensiblen Haplonten r^s_{3-2}.

3.3.4.1.4. AHR in Abhängigkeit vom Atmungsvermögen der Zellen

PATRICK u. HAYNES (1964) haben die Prozesse, die wahrscheinlich den in Hefen nach Bestrahlung mit UV (oder Röntgenstrahlen) zu beobachtenden Dunkelreaktivierungs-Phänomenen zugrundeliegen, als Energie verbrauchende Prozesse gekennzeichnet, die ähnlich wie normale Wachstumsprozesse besondere Bedingungen benötigen wie z.B. bestimmte Temperatur, pH-Wert, Gegenwart von ATP in der Zelle usw. Stoffe, die hemmend in den oxidativen Stoffwechsel der Zelle eingreifen (wie best. Kationen, Kalium-Cyanid, Natrium-Azid, 2,4-di-nitro-Phenol), hemmen auch die Reaktivierung. Außerdem wiesen PATRICK u. HAYNES (1964) und ZIMMERMANN (1968 b) darauf hin, daß Mutanten bei Saccharomyces vini, S. carlsbergensis und S. cerevisiae, die atmungsdefekt sind, keine Dunkelreaktivierung (Liquid-Holding-Recovery) nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen

und einigen chemischen Agentien (wie z.B. salpetriger Säure, Methylmethansulfonat usw.) zeigen.

Um den Einfluß der Atmung auf die AHR nach Bestrahlung zu untersuchen, wurde das Atmungsvermögen der verwendeten Saccharomyces-Stämme überprüft. Nach einer bei HEMPEL u. LASKOWSKI (1964) beschriebenen Methode wurde das Atmungs- bzw. Gärvermögen der Hefezellen im Warburg-Apparat an Hand des Sauerstoffverbrauchs und/oder der Kohlenstoffdioxidabgabe manometrisch bestimmt. Das Gärvermögen erwies sich bei allen Wildtyp- und r^s-Stämmen als unverändert. Die Atmung bzw. der Sauerstoffverbrauch war bei den Mutanten S 15, S 14 und 1930 stark reduziert, so daß für die vorliegenden Untersuchungen nur atmungskompetente Sporenklone mit den entsprechenden r^s-Genen benutzt wurden (vgl. Tabelle III). Ob es sich bei der Atmungsdefiziens der Mutanten S 14, S 15 und 1930 um einen plasmatischen oder genetischen Defekt handelt, wurde nicht näher untersucht.

Es gelang nicht, in atmungsdefekten Stämmen wie S 15, S 14 und 1930 eine positive AHR nach UV-Bestrahlung nachzuweisen. Die Vermutung, daß die fehlende Atmungskompetenz für den Verlust der AHR-Fähigkeit verantwortlich zu machen ist, wurde bestätigt an Hand von isolierten atmungsdefekten Mutanten aus einem haploiden Wildstamm (211-1aM) und aus einem UV-sensiblen Haplonten mit dem r^s_{3-1}-Gen. Eine solche Isolierung ist bei Hefen relativ leicht möglich, da während des normalen Wachstums haploider und diploider Hefezellen atmungsdefekte Zellklone (1 %) auftreten, die sich als vegetative Mutanten weiter züchten lassen (WINDISCH u. LASKOWSKI, 1960; NAGAI, 1969).

Wie die Dosiseffektkurven nach UV-Bestrahlung jeweils mit und ohne 48 Stunden Agar-Haltung bei 30°C zeigen (Abb. 19a u. b), besitzen die atmungskompetenten Zellen des Wildtyps und des r^s_{3-1}-Haplonten ein gutes Reaktivierungsvermögen, während die atmungsdefekten Isolate mit dem Wildtyp oder r^s_{3-1}-Allel keine positive AHR zeigen.

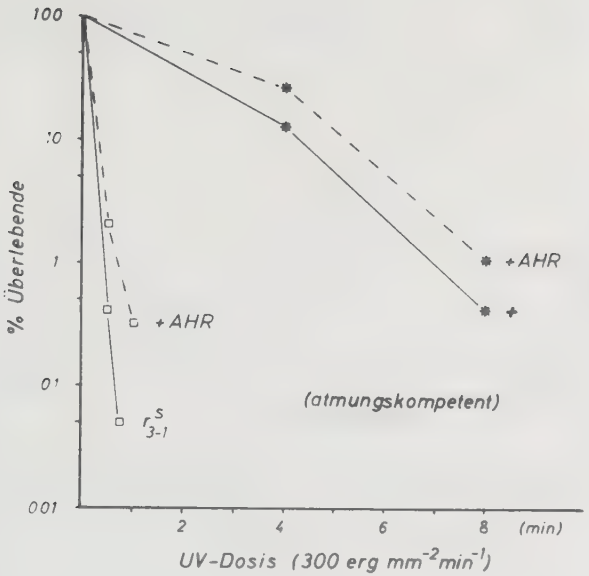

Abb. 19a - AHR in atmungskompetenten Zellen: UV-Dosiseffektkurven für den haploiden Wildtyp (+) 211-1aM und den haploiden r^s_{3-1}-Stamm (S 23-1c) nach sofortigem Ausplatten (ausgezogene Kurven) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR, gestrichelte Kurven).

In atmungsdefekten Wildtypzellen ergibt sich stattdessen ein negativer AHR-Effekt, der jedoch nicht in atmungsdefekten r^s_{3-1}-Zellen in gleicher Weise auftritt.

Ein Vergleich der UV-Dosiseffektkurven in Abb. 19a u. b für die atmungsdefekten und atmungskompetenten Stämme (Wildtyp und r^s_{3-1}) zeigt, daß die Überlebenskurven weitgehend identisch sind, d.h. daß die Atmungsdefiziens keine Bedeutung für die Überlebensrate nach UV-Bestrahlung hat.

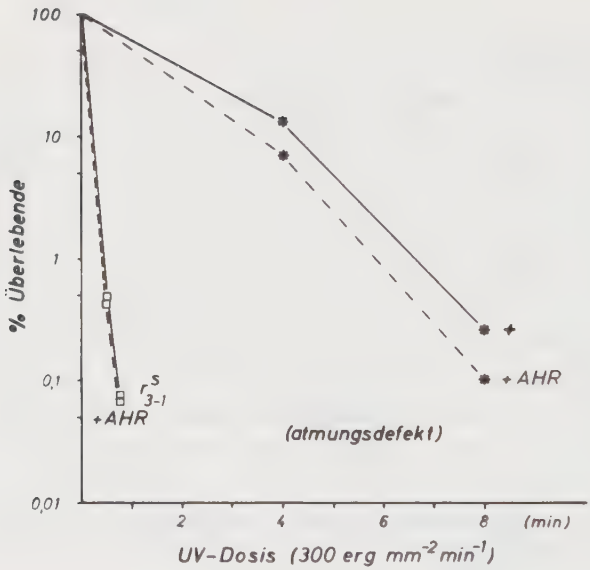

Abb. 19b - AHR in atmungsdefekten Zellen: UV-Dosiseffektkurven für einen abgeleiteten atmungsdefekten Zellklon des haploiden Wildtyp-Stammes (+) 211-1aM und des haploiden r^s_{3-1}-Stammes (S 23-1c) nach sofortigem Ausplatten (ausgezogene Kurven) und nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR, gestrichelte Kurven).

3.3.4.1.5. Zeitabhängigkeit der AHR

Um eine Vorstellung von der Effektivität der AHR pro Zeiteinheit bei den strahlensensiblen Stämmen und dem Wildtyp zu gewinnen, wurde das Ansteigen der Überlebensrate nach verschiedenen Zeiten der Agar-Haltung in UV-bestrahlten Zellen verfolgt. Besonders interessant erscheint dabei die Frage, ob die in r^s_{3-1}-Zellen und in r^s_{3-2}-Zellen (ausgehend von Überlebensraten von weniger als 0,5 %) noch zu beobachtende AHR mit gleicher Wirksamkeit pro Zeiteinheit zu einer Erhöhung der Überlebensrate führt wie in Wildtyp-Zellen.

Wie in Abb. 20a dargestellt, ist die Steigerung der Überlebensrate nach UV-Bestrahlung bei haploiden r^s_{3-1}-, r^s_{3-2}- und Wildtyp-Zellen in unterschiedlicher Weise abhängig von der Dauer der Agar-Haltung (AH).

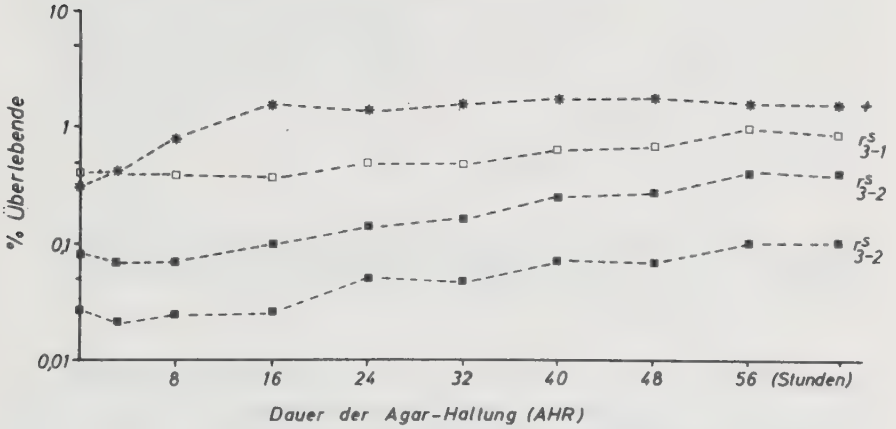

Abb. 20a - Zeitabhängigkeit der AHR (Agar-Haltungs-Reaktivierung) in haploiden Stämmen: Wildtyp + (211-1aM), r^s_{3-1}-Stamm (S 13) und r^s_{3-2}-Stamm (S 24-12c). Für r^s_{3-2}-Zellen sind zwei Versuche mit verschiedenen Anfangs-Überlebensraten angegeben.

Nach etwa 16 Stunden AH bei 30°C erreichen UV-bestrahlte Wildtyp-Zellen ein maximales Überlebensniveau, das dann über 64 Stunden AH etwa konstant bleibt. In UV-bestrahlten r^s_{3-1}- und r^s_{3-2}-Zellen erhöht sich dagegen die Anzahl der Überlebenden wesentlich langsamer. Maximale Werte werden erst nach 48 - 64 Stunden AH beobachtet.

Trotz verschiedener Überlebensbereiche zu Anfang steigen die Überlebensraten von r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Zellen etwa parallel an (für r^s_{3-2}-Zellen sind zwei Bereiche aufgetragen). Offensichtlich spielt die anfängliche Inaktivierungsrate für die Effektivität der nachfolgenden AHR keine ausschlaggebende Rolle (zumindest nicht in dem Überlebensbereich unter 1 %).

Alle Werte in der Darstellung (Abb. 20a) wurden jeweils auf unbestrahlte, aber sonst gleichbehandelte Kontrollen bezogen. Während der Zeit der AH wurden nur die UV-sensiblen Stämme inaktiviert (n. 48 Std. AH bei r^s_{3-1} 50 %, bei r^s_{3-2} etwa 90 % Überlebende), die Kontrolle der Wildtyp-Zellen blieb etwa konstant.

Die Kurven für die Zeitabhängigkeit der AHR in homozygoten Diplonten zeigen einen ähnlichen Verlauf wie bei den Haplonten (Abb. 20b).

Beim Wildtyp-Diplonten steigt die Überlebensrate während der ersten 16 Stunden AH von 0,2 % auf etwa 0,6 %, im $r^s_2r^s_2$-Diplonten wesentlich stärker von 0,2 % auf etwa 1,8 % in der gleichen Zeit. Eine maximale Überlebensrate gewinnen die beiden Diplonten etwa nach 40 Stunden AH, das Maximum liegt allerdings beim $r^s_2r^s_2$-Diplonten erheblich höher als beim Wildtyp.

Wesentlich langsamer und weniger wirksam erhöht sich die Anzahl der Überlebenden bei $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$ und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$-Diplonten. Der maximale Wert liegt erst bei 48 Stunden AHR. Dieser langsame Anstieg entspricht etwa dem der Haplonten r^s_{3-1} und r^s_{3-2}. Daraus wird erkenntlich, daß die geringe AHR, die in r^s_{3-2}-Haplonten und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$-Diplonten bei geringen Überlebensraten nach UV-Bestrahlung noch festzustellen ist, mit etwa der gleichen Wirksamkeit abläuft wie in Stämmen mit dem r^s_{3-1}-Allel.

Es ist interessant zu vermerken, daß der diploide hetero-

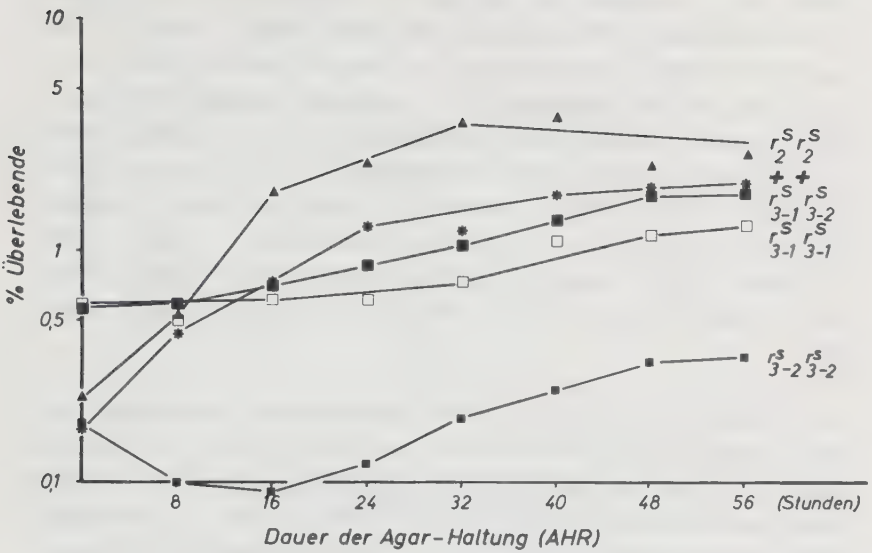

Abb. 20b - Zeitabhängigkeit der AHR (Agar-Haltungs-Reaktivierung) in homozygoten Diplonten: Wildtyp ++ (2012), $r^s_2 r^s_2$-Stamm (S 2095), $r^s_{3-1} r^s_{3-1}$-Diplont (S 2093) und $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$-Diplont (S 2094). Zum Vergleich ist die Reaktivierungskurve auch für den heteroallelen $r^s_{3-1} r^s_{3-2}$-Diplonten angegeben.

zygote Stamm $r^s_{3-1} r^s_{3-2}$ mit genau der gleichen Effektivität wie die entsprechenden homozygoten Diplonten $r^s_{3-1} r^s_{3-1}$ und $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$ reaktiviert werden kann (Abb. 20b). Genetisch kann das als Nachweis der Nichtkomplementierung der r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Allele auch hinsichtlich der AHR-Fähigkeit angesehen werden.

3.3.4.2. Photoreaktivierungsvermögen der r^s-Stämme

Im allgemeinen besitzen Wildtyp-Hefe-Zellen ein ausgeprägtes Photoreaktivierungsvermögen, das eine signifikante

Erhöhung der Überlebensrate nach UV-Bestrahlung ermöglicht, wenn die UV-bestrahlten Zellen dem Licht einer Photoreaktivierungslampe (Wellenlänge zwischen 3600 u. 4200 Å) ausgesetzt werden. Im Gegensatz zur Dunkelreaktivierung wie z.B. AHR, an der wahrscheinlich mehrere Enzyme beteiligt sind, beruht die Photoreaktivierung auf der Wirkung eines Photoreaktivierungsenzyms (MUHAMMED, 1966), das spezifisch Pyrimidin-Dimere unter Zufuhr von längerwelligem UV-Licht spalten kann. Es wird allgemein angenommen (s. auch PARRY u. PARRY, 1969), daß bei der Hefe hauptsächlich diese direkte enzymatische Form der Photoreaktivierung zu finden ist.

Um festzustellen, ob die Photoreaktivierung ungestört und mit gleicher Effektivität wie im Wildtyp auch in strahlensensiblen Stämmen ablaufen kann, wurden Zellen der haploiden und homozygoten diploiden r^s-Stämme und des Wildtyps nach UV-Bestrahlung dem Licht einer Photoreaktivierungslampe ausgesetzt.

Wie aus Abb. 21a und b zu ersehen ist, führt die Photoreaktivierung bei allen Stämmen schon in verhältnismäßig kurzer Zeit, nach 30 Minuten Belichtung bei 25 - 30°C zu einem maximalen Überlebensniveau, das etwa bis zu zwei Stunden konstant bleibt. Das Ausmaß der Photoreaktivierung ist jedoch nicht in allen Stämmen gleich. Während in den haploiden und homozygoten diploiden Stämmen mit den Allelen r^s_{3-1} oder r^s_{3-2} ähnlich wie in den Wildtypstämmen eine erhebliche Steigerung der Überlebensrate durch Photoreaktivierung möglich ist, ist diese Erhöhung der Überlebensrate in Haplonten und homozygoten Diplonten mit dem r^s_2-Gen nur gering. Das Photoreaktivierungsvermögen der r^s_2-Haplonten und $r^s_2 r^s_2$-Diplonten ist im Vergleich zum Wildtyp demnach deutlich reduziert.

Um das Ausmaß der Photoreaktivierung vergleichen zu können, wurden Dosiseffektkurven und die zugehörigen Reaktivierungskurven mit maximaler Photoreaktivierung (nach 60 Minuten Belichtung) aufgenommen.

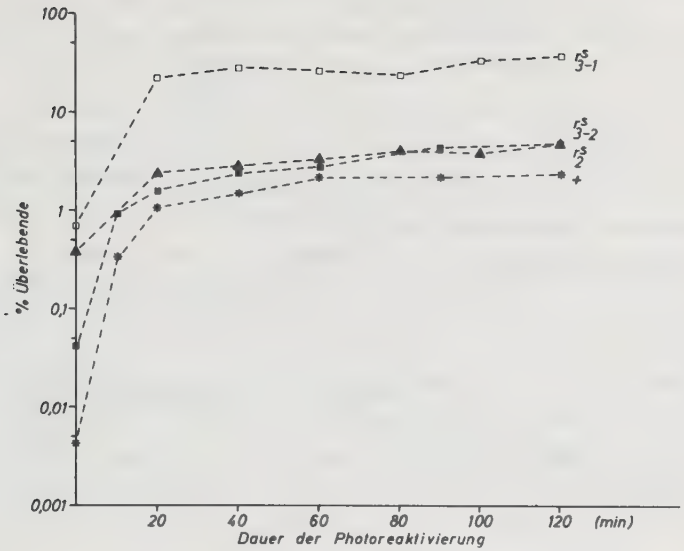

Abb. 21a - Zeitabhängigkeit der Photoreaktivierung (nach UV-Bestrahlung) bei haploiden Stämmen: Wildtyp + (211-1aM), r^s_2-Haplont (S 15), r^s_{3-1}-Haplont (S 13) und r^s_{3-2}-Haplont (S 14).

Tabelle IX gibt eine Aufstellung der Dosismodifikationsfaktoren für die PhR (bezogen auf 1 % Überlebende), die aus den Dosiseffektkurven ermittelt wurden.

Tabelle IX

Dosismodifikation durch Photoreaktivierung

Gen-Symbol	Dosismodifikationsfaktoren (LD_1 mit PhR/LD_1)	
	Haplonten	Diplonten
+	2,1	3,0 [1]
r^s_1	1,5 [2]	1,9 [1]
r^s_2	1,6	1,3

Gen-Symbol	Dosismodifikationsfaktoren (LD_1 mit PhR/LD_1)	
	Haplonten	Diplonten
r^s_{3-1}	2,4 [1]	2,1 [1]
r^s_{3-2}	2,4 [1]	2,6 [1]

1) angegebene Werte sind extrapoliert.
2) Werte veröffentlicht von LASKOWSKI et al. (1968).

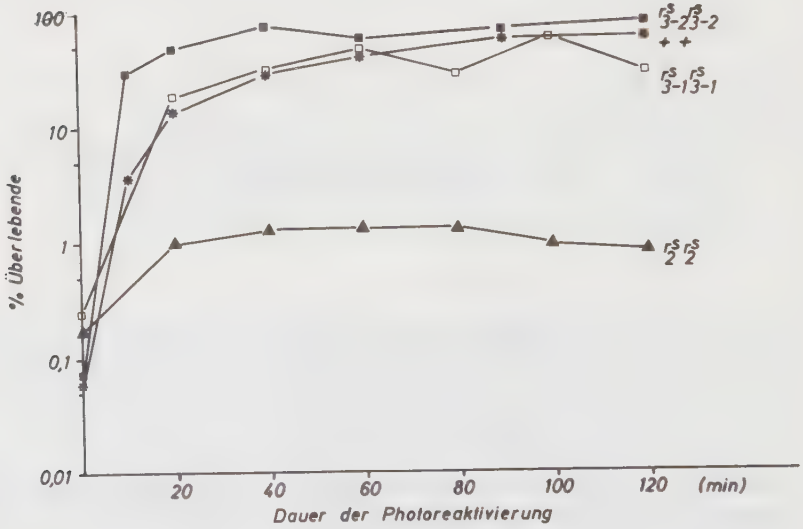

Abb. 21b - Zeitabhängigkeit der Photoreaktivierung bei homozygoten Diplonten: Wildtyp ++ (2012), $r^s_2r^s_2$-Diplont (S 2095), $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$-Diplont (S 2093) und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$-Diplont (S 2094).

Die deutliche Photoreaktivierung in den haploiden und homozygoten diploiden Stämmen mit dem Wildtyp-Gen (+), oder den Allelen r^s_{3-1} und r^s_{3-2} ist durch Dosismodifikationsfaktoren

von gleich oder größer als 2,1 gekennzeichnet. Die DMF für die Stämme mit den Genen r_1^s und r_2^s sind geringer als 2,1 (DMF der Haplonten: 1,5 und 1,6; DMF für die Diplonten: 1,9 und 1,3) und verdeutlichen die reduzierte Photoreaktivierung bei den r_1^s-und r_2^s-Stämmen. Der DMF des $r_2^s r_2^s$-Diplonten (1,3) liegt sogar noch tiefer als der des entsprechenden Haplonten (1,6).

Die Mutation, die wahrscheinlich dem reduzierten PhR-Vermögen zugrundeliegt, wurde nicht näher analysiert. Vermutlich ist durch diese Mutation entweder die normale Enzym-Aktivität bzw. die Spezifität des PhR-Enzyms verändert (was z.B. eine bevorzugte Monomerisierung bestimmter Pyrimidin-Dimere (z.B. Thymin-Dimere) bedingen könnte) oder die Lebensdauer der in der Zelle vorhandenen funktionsfähigen PhR-Enzymmoleküle ist begrenzt.

Da im allgemeinen die Dosismodifikationsfaktoren für die PhR (Tabelle IX, S. 83/84) größer sind als die entsprechenden DMF für die AHR (Tabelle VII, S. 71) - ausgenommen der $r_2^s r_2^s$-Diplont, dessen DMF für PhR (1,3) niedriger liegt als der DMF für die AHR (1,5) - ist ersichtlich, daß die PhR die Überlebensrate nach UV-Bestrahlung wesentlich wirksamer steigern kann, als es der (wahrscheinlich mehrstufige, enzymatische) Dunkelreparaturprozeß (AHR) vermag.

3.3.4.3. Zusammenwirken von PhR und AHR

Die Spezifität der enzymatischen PhR erlaubt es, UV-induzierte Pyrimidin-Dimere und deren Beseitigung an Hand der Photoreaktivierung in UV-bestrahlten Zellen zu erkennen. Um zu untersuchen, ob die in r^s-Zellen ablaufenden Dunkelreaktivierungsprozesse (AHR) mit gleicher Wahrscheinlichkeit wie im Wildtyp das Substrat der Photoreaktivierung (UV-induzierte Dimere) angreifen, oder ob eine veränderte Wahrscheinlichkeit dafür besteht, andere Schäden als Pyrimidin-Dimere zu beseitigen, die für das Überleben

der Zellen bedeutsam sind, wurden beide Reaktivierungsprozesse miteinander verknüpft.

Die UV-bestrahlten Zellen wurden dazu jeweils maximal photoreaktiviert (durch 60 Minuten Belichtung mit PhR-Licht) und zusätzlich noch 48 Stunden auf reinem Agar gehalten, bevor sie mit Nährmedium überschichtet wurden und mit den Zellteilungen beginnen konnten.

Für jeden zu überprüfenden Stamm wurden demnach vier verschiedene Überlebenskurven ermittelt und zur Analyse angegeben:
1.) UV-Dosiseffektkurve ohne zusätzliche Reaktivierung
2.) UV-Dosiseffektkurve mit PhR
3.) UV-Dosiseffektkurve mit AHR
4.) UV-Dosiseffektkurve mit PhR und anschließender AHR.

Abb. 22a zeigt die verschiedenen Überlebenskurven 1-4 für den haploiden Wildtyp 211-1aM und den Haplonten mit dem r^s_2-Gen. Während im Wildtyp nach maximaler PhR durch eine anschließende AHR keine Erhöhung der Überlebensrate erzielt wird (die Überlebenskurve mit PhR und die Kurve mit PhR plus AHR sind weitgehend identisch), ist im haploiden r^s_2-Stamm nach Photoreaktivierung noch eine zusätzliche Steigerung durch die nachfolgende AHR möglich.

Die Überlebenskurven für die haploiden Stämme mit den Allelen r^s_{3-1} und r^s_{3-2} lassen keine zusätzliche Erhöhung der Überlebensrate durch AHR nach Ablauf der Photoreaktivierung erkennen (Abb. 22b u. c). Ähnlich wie beim Wildtyp-Haplonten (Abb. 22a) folgt daraus für den r^s_{3-1}-Stamm, der ja durchaus die Fähigkeit zur AHR besitzt, wenn diese auch weniger effektiv abläuft als im Wildtyp (s. Abb. 20a), daß das Substrat (die gesetzten UV-Schäden in der DNS) für die AHR durch die Photoreaktivierung vermutlich aufgebraucht ist. Da das AHR-Vermögen des r^s_{3-2}-Stammes noch wesentlich geringer ist als das des r^s_{3-1}-Stammes,

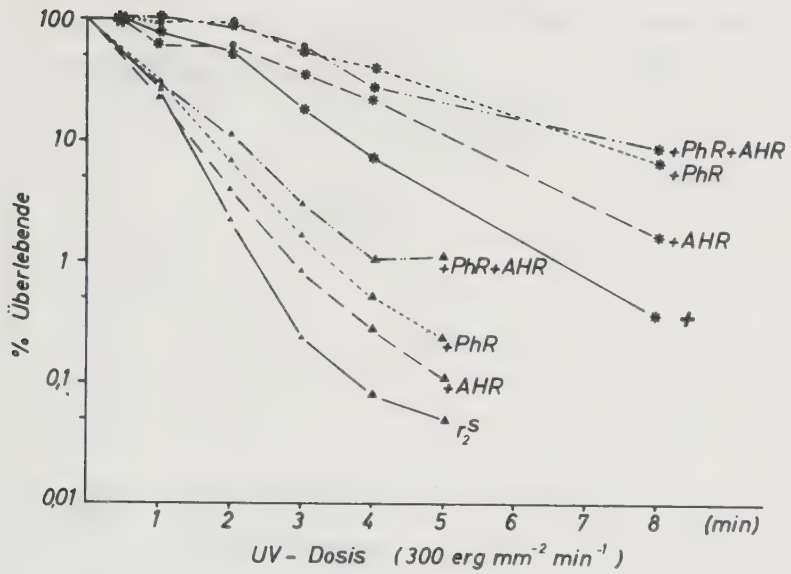

Abb. 22a - UV-Dosiseffektkurven für den haploiden Wildtypstamm 211-1aM (+) und den strahlensensiblen r_2^s-Stamm (S 25-13b) nach dem sofortigen Ausplatten (ausgezogene Kurven), nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR), nach Photoreaktivierung (+ PhR) und nach Photoreaktivierung plus anschließender Agar-Haltung (+ PhR + AHR).

ist nach Ablauf der Photoreaktivierung keine Steigerung der Überlebensrate durch AHR zu erwarten.

Um zu prüfen, ob im homozygoten $r_2^s r_2^s$-Diplonten (S 2095) ein ähnliches Zusammenwirken von PhR (reduziert) und AHR wie im entsprechenden r_2^s-Haplonten vorliegt, wurden die verschiedenen Überlebenskurven für den $r_2^s r_2^s$-Diplonten aufgenommen (s. Abb. 23). Die PhR ist in diesem Diplonten so reduziert, daß die Kurve für die PhR noch unterhalb der Kurve für die AHR verläuft.

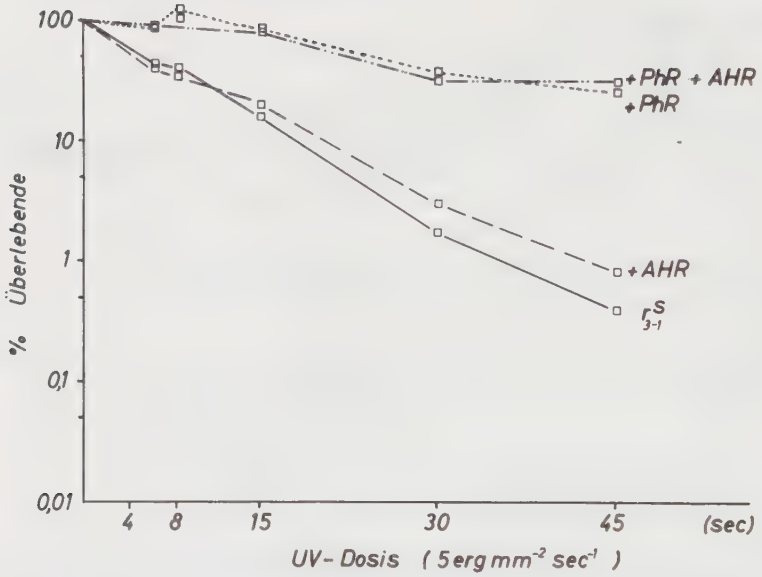

Abb. 22b - UV-Dosiseffektkurven für den haploiden strahlensensiblen r^s_{3-1}-Stamm (S 23-21b) nach dem sofortigen Ausplatten (ausgezogene Kurve), nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR), nach Photoreaktivierung (+ PhR) und nach Photoreaktivierung mit anschließender Agar-Haltung (+ PhR + AHR).

Wahrscheinlich ist die reduzierte Photoreaktivierung in diesem Diplonten nicht in der Lage, alle UV-induzierten Pyrimidin-Dimere in diesem Stamm zu beseitigen. Wie die Überlebenskurve für UV nach Photoreaktivierung und anschließender AHR zeigt, ist nach erfolgter Photoreaktivierung noch eine weitere Steigerung der Überlebensrate durch AHR möglich, da vermutlich durch AHR die restlichen Dimere beseitigt werden, die während der Photoreaktivierung nicht monomerisiert werden konnten.

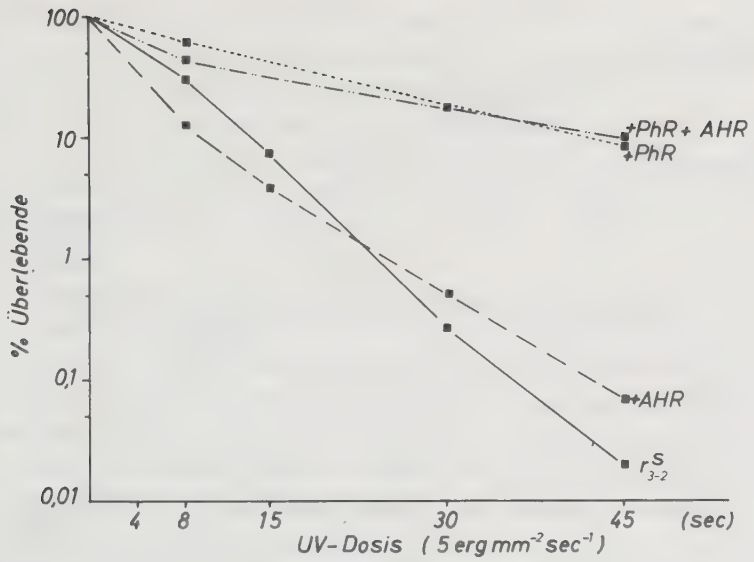

Abb. 22c - UV-Dosiseffektkurven für den haploiden strahlensensiblen r^s_{3-2}-Stamm (S 24-12c) nach dem sofortigen Ausplatten (ausgezogene Kurve), nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR), nach Photoreaktivierung (+ PhR) und nach Photoreaktivierung mit anschließender Agar-Haltung (+ PhR + AHR).

Das Zusammenwirken von PhR und AHR in $r^s_2 r^s_2$-Diplonten erfolgt ähnlich wie im r^s_2-Haplonten. Die Reihenfolge der Reaktivierungsbehandlungen scheint dabei keine Rolle zu spielen. Ein Versuch, in dem zuerst die UV-bestrahlten $r^s_2 r^s_2$-Zellen 48 Stunden in Puffer gehalten wurden (Liquid-Holding-Recovery) und sofort anschließend noch photoreaktiviert wurden, erbrachte etwa die gleiche Additivität der einzelnen Reaktivierungseffekte.

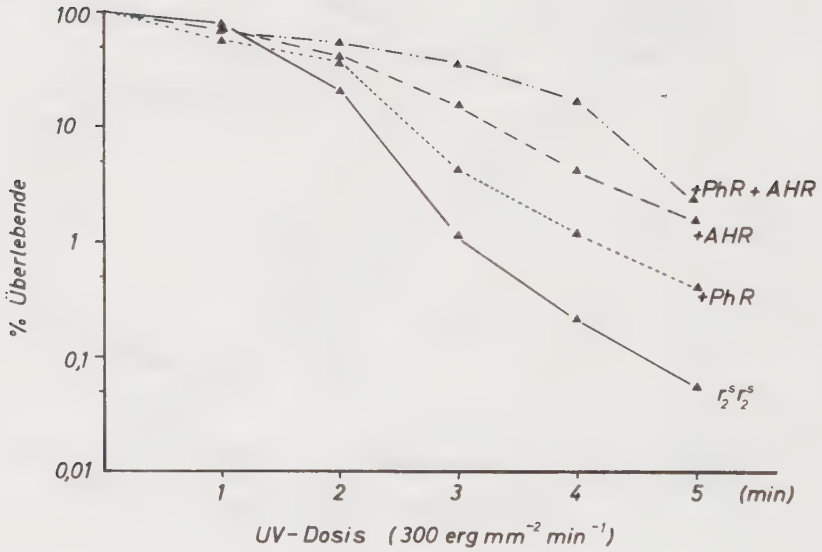

Abb. 23 - UV-Dosiseffektkurven für den homozygoten Diplonten $r_2^s r_2^s$ (S 2095) nach sofortigem Ausplatten (ausgezogene Kurve), nach 48 Stunden Agar-Haltung (+ AHR), nach Photoreaktivierung (+ PhR) und nach Photoreaktivierung mit anschließender Agar-Haltung (+ PhR + AHR).

4. DISKUSSION

An Hand von drei strahlensensiblen Mutanten von Saccharomyces, die nach Behandlung mit 1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin aus einem haploiden Ausgangsstamm isoliert worden sind, wurden die genetische Kontrolle der Strahlensensibilität, der Einfluß der identifizierten mutierten Gene r_2^s, r_{3-1}^s bzw. r_{3-2}^s auf die Strahlenempfindlichkeit gegenüber UV- und Röntgenbestrahlung bei haploiden und homozygoten diploiden Stämmen und das Reaktivierungsvermögen vornehm-

lich nach UV-Bestrahlung untersucht.

Im folgenden soll dargestellt werden, welche Rückschlüsse sich aus den Untersuchungsergebnissen auf die Eigenschaften der strahlensensiblen Hefemutanten bezüglich der Existenz und Wirkungsweise von Dunkelreparaturmechanismen in Hefen im Vergleich zu den von Bakterien bekannten Mechanismen ("excision-repair" und "post-replication-repair") ergeben.

4.1. Genetische Kontrolle der Strahlensensibilität

Ähnlich wie bei strahlensensiblen Bakterienmutanten konnte für die in dieser Arbeit dargestellten Hefemutanten nachgewiesen werden, daß die Strahlensensibilität durch Mutationen bestimmter Gene verursacht wird und nicht Folge einer plasmatischen Veränderung ist. Während in haploiden Stämmen die mutierten Allele r^s_{3-1} und r^s_{3-2} extreme UV-Empfindlichkeit und eine mittlere Röntgenstrahlensensibilität hervorrufen, bewirkt das mutierte Gen r^s_2 (ähnlich wie das mutierte Gen r^s_1, vgl. LASKOWSKI et al., 1968) mittlere UV- und Röntgenempfindlichkeit.

In Komplementierungstests konnte gezeigt werden, daß das r^s_3-Gen mit dem uvs 9 Gen (beschrieben von RESNICK) und dem uvs 2 Gen (beschrieben von COX u. PARRY) (RESNICK, 1968/1969 und COX u. PARRY, 1968) identisch ist. Wie RESNICK (1968) nachgewiesen hat, ist das uvs 9 Gen wiederum identisch mit dem Centromer-gekoppelten uvr 9 Gen (Abstand vom Centromer n. RESNICK: 23 Morganeinheiten), das von SNOW (1967) beschrieben worden ist.

Eine Übersicht über die insgesamt bei der Hefe Saccharomyces identifizierten Gene, die die Strahlensensibilität kontrollieren, gibt Tabelle XI, die nach Angaben der verschiedenen Autoren zusammengestellt worden ist. Einige der isolierten strahlensensiblen Mutanten sind noch nicht auf ihre genetische Identität überprüft worden , z.B. die Mutanten

von COX u. PARRY mit denen von SNOW (1967) und ZAKHAROV et al. (1970), so daß sich die Anzahl der uvs-Gene noch ändern kann.

Wenn alle aufgeführten Gene tatsächlich voneinander verschieden sind, ergeben sich

- 25 uvs Gene, die die UV-Sensibilität beeinflussen
- 8 uxs Gene, die gleichzeitig für die Sensibilität gegenüber UV- und Röntgenstrahlen verantwortlich sind und
- 4 xs Gene, die die Sensibilität gegenüber Röntgenstrahlen kontrollieren.

Sind jedoch einige der identifizierten Gene von COX u. PARRY (1968) mit denen von NAKAI u. MATSUMOTO (1967), SNOW (1967), RESNICK (1968) und ZAKHAROV et al. (1970) identisch, so läßt sich aus den Daten ableiten, daß mindestens 19 uvs Gene, 6 uxs Gene und 3 xs Gene (insgesamt also mindestens 28 Gene) die Strahlensensibilität der Hefe kontrollieren.

Tabelle XI

Genetische Kontrolle der Strahlensensibilität bei Hefen

Gen-Symbole [1]	Isolierte Mutanten	Strahlensensibilität [2] UV-Licht	Röntgen	Autoren
uvs 1	UV^s_1	---	+	NAKAI u. MATS.,1967
	uvs 1-2	---	+	RESNICK, 1968
	uvs_z	---	+	MOUSTACCHI, 1969
uvs 2	uvr 9	---	+	SNOW, 1967
	uvs 9 (2)	---	+	RESNICK, 1968
	uvs 2 (10)	---	+	COX u. PARRY, 1968
	r^s_3 (2)	---	--	(diese Arbeit)
? [3]	UV^s_2	---	+	NAKAI u. MATS.,1967
?	uvs 1	---	+	ZAKHAROV et al.,1970
uvs 4	uvr 4	---	+	SNOW, 1967
uvs 4	uvs 4 (5)	---	+	COX u. PARRY, 1968

Gen-Symbole [1]	Isolierte Mutanten	Strahlensensibilität [2] UV-Licht	Röntgen	Autoren
uvs 13	uvs 13 (11)	---	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 5	uvr 5	--	+	SNOW, 1967
uvs 1	uvs 1 (3)	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 3	uvs 3	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 8	uvr 8	--	+	SNOW, 1967
uvs 10	uvs 10 (4)	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 11	uvs 11	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 12	uvs 12 (12)	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 14	uvs 14 (5)	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 16	uvs 16 (2)	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 17	uvs 17	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 18	uvs 18	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 19	uvs 19	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 20	uvs 20	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 21	uvs 21	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 22	uvs 22	--	+	COX u. PARRY, 1968
uvs 10	uvr 10	-	+	SNOW, 1967
uvs 11	uvr 11	-	+	SNOW, 1967
?	uvs 2	-	+	ZAKHAROV et al., 1970
uxs 1	uxs 1	--	--	RESNICK, 1968
uxs 2	r_1^s	-	--	LASKOWSKI et al.,1968
uxs 3	r_2^s	-	--	(diese Arbeit)
uxs 5	uvs 5 (2)	-	--	COX u. PARRY, 1968
uxs 6	uvs 6	---	--	COX u. PARRY, 1968
uxs 8	uvs 8 (2)	--	-	COX u. PARRY, 1968
uxs 9	uvs 9 (3)	--	--	COX u. PARRY, 1968
uxs 15	uvs 15 (3)	--	-	COX u. PARRY, 1968
xs 1	xs 1	+	---	RESNICK, 1968 u. 1969
xs 2	xs 2 (2)	-	--	RESNICK, 1968 u. 1969
	rec^-	+	--	RODARTE et al., 1968
xs 3	xs 3	+	-	RESNICK, 1968 u. 1969

Gen-Symbole [1]	Isolierte Mutanten	Strahlensensibilität [2] UV-Licht	Röntgen	Autoren
	rec^-	+	-	RODARTE et al., 1968
xs 4	X_1^s	-	---	NAKAI u. MATS., 1967
Xr_4	X_{r4}	+	resistent	MOUSTACCHI, 1969 b

1) Einheitliches Symbolsystem identifizierter Gene, wobei sowohl die unterstrichenen Gene als auch die nicht unterstrichenen Gene jeweils untereinander verschieden sind. Inwieweit die Gene dieser beiden Gruppen voneinander genetisch zu unterscheiden sind, muß noch überprüft werden.

2) Relativ zu anderen strahlensensiblen Mutanten bedeutet:
"---": extrem sensibel
"--" : mittlere Sensibilität
"-" : schwach sensibel
"+" : wie Wildtyp
In Klammern hinter der Mutantenbezeichnung ist jeweils die Anzahl der gefundenen Allele angegeben.

3) Einordnung erfolgte aufgrund eines Vergleiches der Dosis-effektkurven.

Die große Zahl der uvs-, uxs- und xs-Gene deutet daraufhin, daß die genetische Kontrolle der Strahlensensibilität offensichtlich bei Hefen wesentlich komplexer ist als bei den Bakterien. Bei E. coli K 12 sind z.B. nur etwa 4 uvr-Gene und 3 rec-Gene bekannt geworden.

Die Gene, die bei Saccharomyces die Strahlensensibilität kontrollieren, sind teilweise auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert: das uvs 1 Gen liegt z.B. auf dem XVI. Chromosom (19,5 Morganeinheiten vom Centromer entfernt), und das uvs 9 Gen, von dem mehrere Mutationen bekannt sind (SNOW, 1967; COX u. PARRY, 1968; RESNICK, 1968 und AVERBECK et al., 1970)

befindet sich etwa 23 Morganeinheiten vom Centromer entfernt auf dem neu identifizierten XVII Chromosom (RESNICK, 1968). Die uvs, uxs und xs-Gene bei Saccharomyces liegen demnach ähnlich wie die entsprechenden uvr und rec-Gene bei den Bakterien verstreut über das ganze Genom vor (vgl. HOWARD-FLANDERS, 1968).

Auf welche Weise die verschiedenen mutierten Gene die veränderte Strahlensensibilität der Mutanten hervorrufen, ist noch weitgehend unklar. Vorstellbar sind im wesentlichen drei Möglichkeiten:

1. Die Mutation führt zur Veränderung an gewissen Zellstrukturen (Zell- oder Kernmembranen etc.) und Zellorganellen. Z.B. könnte eine Veränderung der Histone in der Zelle eine Veränderung der Chromosomenstruktur und damit der Genexpression zur Folge haben (GEORGIEV, 1969).
2. Die Mutation ruft eine direkte Sensibilisierung der DNS oder anderer Zellkomponenten hervor. Z.B. könnten durch Veränderungen an den DNS-Basen andere Bestrahlungsprodukte bei Bestrahlung auftreten (HANAWALT, 1968).
3. Die Mutation bewirkt eine Veränderung der Enzyme, die bei der enzymatischen Reparatur von Strahlenschäden an der DNS eine Rolle spielen.

Obwohl eine Veränderung gewisser Zellstrukturen (1) oder eine direkte Sensibilisierung der DNS (2) nicht ganz ausgeschlossen werden können (COX u. PARRY, 1968), gibt es doch Kriterien, die auf eine Änderung enzymatischer Reparaturmechanismen in strahlensensiblen Mutanten hinweisen (COX u. PARRY, 1968):

a) Fähigkeit zur Dunkelreaktivierung (AHR):

Wird durch AHR nach UV-Bestrahlung in strahlensensiblen Mutanten keine Steigerung der Überlebensrate (Dosismodifikation) wie im Wildtyp erreicht, oder sogar eine zusätzliche Inaktivierung, so ist ein Dunkelreperaturmechanismus ausgefallen, und es erscheint nicht unbegründet,

daß die Strahlensensibilität durch eine gleiche Ursache hervorgerufen wird.

b) Sensibilität gleichzeitig gegenüber anderen Agentien:

Ist in den strahlensensiblen Mutanten gleichzeitig eine Sensibilität gegenüber anderen Mutagenen mit bestimmter Spezifität (z.B. P^{32} oder Basenanaloge) vorhanden, dürfte der Strahlensensibilität ein veränderter Reparaturprozeß und keine DNS-Sensibilisierung gegenüber Strahlen zugrunde liegen.

Ist eines dieser Kriterien erfüllt und ist zusätzlich die Häufigkeit für das Auftreten von Mutations- oder Rekombinationsereignissen bei den strahlensensiblen Mutanten wesentlich verändert (z.B. nach UV-Bestrahlung), so ist wahrscheinlich ein Reparaturprozeß betroffen, der nicht nur für die Letalität, sondern auch für die Entstehung von Mutationen bzw. für den Ablauf von Rekombinationsprozessen eine entscheidende Rolle spielt.

Da die meisten der aufgeführten strahlensensiblen Hefestämme (s. Tabelle XI) jeweils wenigstens einem dieser Kriterien genügen[1)], erscheint es nicht unberechtigt, analog zu den Befunden bei Bakterien aus der genetischen Kontrolle der Strahlensensibilität auf das Vorhandensein von enzymatischen Reparatursystemen zu schließen, die in ungestörtem Zustand zur Strahlenresistenz der Wildtyp-Zellen führen,

Die verhältnismäßig große Zahl von mindestens 28 verschiedenen Genen bei Saccharomyces (s. Tabelle XI), die für die Strahlensensibilität verantwortlich sind, läßt auf eine ähnliche Zahl veränderter Proteine schließen. Jedoch nicht alle dieser Proteine müssen notwendigerweise Reparaturenzyme sein, sondern es ist nicht auszuschließen, daß einige dieser Proteine bei der Regulation von Reparaturprozessen eine Rolle spielen.

---

1) Die Details können den Originalarbeiten entnommen werden.

4.2. Strahlensensibilität der haploiden und homozygoten diploiden r^s-Stämme

Wie aus den Dosiseffektkurven nach UV- und Röntgenbestrahlung hervorgeht, haben die r^s-Gene einen unterschiedlichen Einfluß auf die Strahlensensibilität.

1. Die r^s-Gene (r^s_1, r^s_2 und r^s_3) bewirken im Vergleich zum Wildtyp in haploiden und diploiden Stämmen eine unterschiedlich starke Reduktion des Schulterbereiches in den UV-Dosiseffektkurven (Abb. 11).
2. Die relative Empfindlichkeitsverteilung nach UV-Bestrahlung der r^s-Haplonten entspricht annähernd der relativen Strahlensensibilität der homozygoten r^s- Diplonten (Abb. 11).
3. Die Empfindlichkeitsverteilung gegenüber Röntgenstrahlung (Abb. 12) ist anders als gegenüber UV: Die haploiden r^s-Stämme sind etwa gleich empfindlich gegenüber Röntgenstrahlen, während die entsprechenden r^s-Diplonten unterschiedlich sensibel sind: $r^s_1 r^s_1$ und $r^s_2 r^s_2$-Diplonten sind deutlich Rö-sensibel, $r^s_{3-1} r^s_{3-1}$ und $r^s_{3-2} r^s_{3-2}$-Stämme sind dagegen etwa genauso resistent wie der Wildtypdiplont.

Nach HAYNES (1966) kann als Ursache für Schultern in vielen Dosiseffektkurven (ausgenommen sind z.B. Hitzeinaktivierungskurven) angenommen werden, daß in UV-bestrahlten Zellen (z.B. E. coli-Zellen) für die induzierten DNS-Schäden wirksame enzymatische Reparaturmechanismen vorhanden sind, die erst bei erhöhter Strahlendosis zunehmend angegriffen werden. Somit läßt sich die starke Reduktion der Schulter in den Überlebenskurven der strahlensensiblen Hefestämme nach UV-Bestrahlung als Verlust einer Reparaturfähigkeit deuten, die im Wildtyp eine ausgeprägte Schulter bzw. Strahlenresistenz zur Folge hat.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß Schultern teilweise auch auf eine Akkumulation von Schäden zurückgeführt werden können, die für eine Inaktivierung der Zellen erst erreicht

werden muß. Möglicherweise ist die Existenz eines kleinen (stark reduzierten) Schulterbereiches bei den extrem UV-sensiblen Stämmen als Folge einer solchen Anhäufung von Schäden, die für eine Inaktivierung benötigt wird, zu verstehen. Andererseits ist es jedoch auch denkbar, daß selbst die extrem UV-sensiblen Stämme (mit den Allelen r^s_{3-1} und r^s_{3-2}) noch eine restliche Reparaturaktivität besitzen, die für das Auftreten einer Schulter verantwortlich ist.

Da die Schulterbereiche in den UV-Dosiseffektkurven bei den r^s-Haplonten etwa im gleichen Verhältnis reduziert sind wie bei den entsprechenden homozygoten Diplonten, scheinen die Mechanismen, die der Strahlensensibilität gegenüber UV zugrunde liegen, in Haplonten und Diplonten in ähnlicher Weise wirksam zu sein.

Der unterschiedliche Einfluß der r^s-Gene auf die Strahlensensibilität der Haplonten und Diplonten gegenüber Röntgenbestrahlung und UV (s. Abb. 12) weist daraufhin,

- daß durch Absorption von Röntgenstrahlen andere Schäden als durch UV-Bestrahlung hervorgerufen werden. (Nach SZYBALSKI (1967) werden durch Röntgenstrahlen hauptsächlich Einzel- und Doppelstrangbrüche und Veränderungen der DNS-Basen (Ringbrüche, Desaminierungen, Hydroxilierungen, Peroxydbildungen usw.) induziert) und
- daß die Mechanismen, die an der Rö-Inaktivierung der diploiden Zellen beteiligt sind, von denen in Haplonten verschieden sind.

Offensichtlich begünstigt die Tatsache, daß in Diplonten das Genom in doppelter Form vorliegt, die Überwindung von gesetzten Röntgenschäden (z.B. in den Diplonten $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$ und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$), so daß fast die Strahlenresistenz des Wildtypdiplonten erreicht wird. r^s_{3-1}- und r^s_{3-2}-Haplonten sind dagegen deutlich Rö-sensibel im Vergleich zum resistenten Wildtyphaplonten.

Auch die unterschiedliche Form der Dosiseffektkurven (die Kurven für die Haplonten verlaufen weitgehend exponentiell, während die Dosiseffektkurven für die Diplonten im allge-

meinen einen ausgeprägten Schulterbereich enthalten) spricht für eine andersartige Inaktivierung der Haplonten und Diplonten oder für die Existenz eines wirksamen Reparaturmechanismus, der sich besonders in Diplonten auswirkt.

Der Befund, daß die homozygoten Diplonten $r_1^s r_1^s$ und $r_2^s r_2^s$ deutlich Rö-sensibel sind, läßt sich mit der Annahme erklären, daß durch die mutierten Gene r_1^s und r_2^s Mechanismen betroffen sind, die der Röntgenresistenz der $r_{3-1}^s r_{3-1}^s$, $r_{3-2}^s r_{3-2}^s$ und Wildtyp-Diplonten zugrundeliegen. Es liegt nahe, bei diesen Mechanismen an Vorgänge zu denken, die bevorzugt in Diplonten ablaufen können. Mitotische Rekombinationsvorgänge z.B. könnten nicht nur zur Umgruppierung des Genoms im Verlauf der Kernteilungsvorgänge, sondern u.U. auch zur Wiederherstellung der Kontinuität beschädigter DNS nach Röntgenbestrahlung beitragen, wobei beschädigte Teile ersetzt werden könnten.

Die Annahme eines rekombinationsartigen Reparaturmechanismus, der möglicherweise die Resistenz diploider Zellen gegenüber Röntgenstrahlen bestimmt, und dessen Ausfall, hervorgerufen durch mutierte Gene wie z.B. r_1^s und r_2^s, zur Strahlensensibilität der homozygoten Diplonten führt, kann auch zur Erklärung der Befunde von RESNICK über röntgensensible Mutanten (xs) herangezogen werden. RESNICK (1968) fand eine Korrelation zwischen der Röntgenstrahlenresistenz haploider knospender Wildtyp-Zellen (an einem resistenten Schwanzbereich in der Rö-Dosiseffektkurve zu erkennen) und der Rö-Strahlenresistenz diploider Wildtyp-Zellen (ersichtlich an einem resistenten Schulterbereich).

Haploide und homozygote diploide Stämme mit einem xs-Gen zeichnen sich jedoch im Gegensatz zum Wildtyp dadurch aus, daß der Rö-resistente Schwanzanteil in der Dosiseffektkurve beim Haplonten und der resistente Schulterbereich beim homozygoten Diplonten reduziert sind.

Dieser Zusammenhang kann nach RESNICK so gedeutet werden,

daß ein Reparaturmechanismus vorhanden ist, der in Haplonten nur während der Knospungsvorgänge aktiv ist, in Diplonten jedoch in allen Teilungsstadien wirksam ist. Es erscheint möglich, daß ein solcher Reparaturmechanismus in Form eines rekombinationsartigen Prozesses arbeiten könnte, der durch Austausch von unbeschädigten Tochterstrangregionen in gerade replizierter DNS funktionsfähige DNS-Stränge wiederherstellen kann.

Für diese Annahme eines Rekombinationsprozesses spricht, daß in den röntgensensiblen Stämmen mit dem xs 2 Gen, das mit dem Gen eines rekombinationsdefekten Stammes von RODARTE identisch ist, gleichzeitig die Reparaturfähigkeit für Rö-induzierte Schäden gestört ist (RESNICK, 1969).

Allerdings scheint die Röntgenstrahlenresistenz knospender haploider Zellen nicht unbedingt an genetische Rekombinationsmechanismen gebunden zu sein. Kürzlich haben BENATHEN u. BEAM (1969) an einigen Rö-sensiblen haploiden Mutanten, bei denen die Röntgenstrahlenresistenz der knospenden Zellen signifikant reduziert ist, gezeigt, daß das genetische Rekombinationsvermögen in diesen Mutanten (nachgewiesen an verschiedenen genetischen Markern auf den Chromosomen V und VII) nicht verändert ist.

Möglicherweise gelten nur für bestimmte Mutantengruppen (z.B. Mutanten im xs 2 Gen; RESNICK, 1969) die folgenden Zusammenhänge:

1. Sensibilität gegenüber Röntgenstrahlen in den haploiden Mutanten und den entsprechenden Diplonten.
2. Reduktion der Röntgenstrahlenresistenz von knospenden Zellen der haploiden röntgenstrahlensensiblen Mutanten.
3. Reduktion des resistenten Schulterbereiches in der Rödosiseffektkurve des homozygoten Diplonten.
4. Verändertes Rekombinationsvermögen der Mutanten.

Es erscheint möglich, daß für die strahlensensiblen Stämme

mit dem r_1^s-Gen oder dem r_2^s-Gen ein ähnlicher Zusammenhang besteht, da die Punkte 1. und 3. für diese Stämme zutreffen. Es ist jedoch noch zu prüfen, ob das Rekombinationsvermögen (4) reduziert ist und ob in den Röntgendosiseffektkurven der haploiden Stämme eine Reduktion des resistenten Schwanzanteils (hervorgerufen durch knospende Zellen) (2) nachgewiesen werden kann.

4.3. Zusammenwirken von r^s-Genen in Doppelmutanten

Aus den Befunden über die Strahlensensibilität der r^s-Stämme geht hervor, daß die Allele r_{3-1}^s und r_{3-2}^s hauptsächlich für die extreme UV-Sensibilität verantwortlich sind und weniger für die Sensibilität gegenüber Röntgenstrahlen (wie besonders aus der Röntgenstrahlenresistenz der homozygoten Diplonten $r_{3-1}^s r_{3-1}^s$ und $r_{3-2}^s r_{3-2}^s$ ersichtlich). Die Gene r_1^s und r_2^s haben offensichtlich in Haplonten und Diplonten einen starken Einfluß auf die Sensibilität gegenüber Röntgenstrahlen. Wenn der unterschiedlichen Strahlensensibilität ein Ausfall bestimmter Reparaturprozesse zugrundegelegt werden kann, sollte es möglich sein, aus dem Zusammenwirken verschiedener r^s-Gene zu erkennen, ob durch die r^s-Mutationen verschiedene Reparatursysteme oder bestimmte Schritte innerhalb des gleichen Reparatursystems betroffen sind:

a) Sind durch zwei r^s-Mutationen Schritte innerhalb des gleichen Reparatursystems verändert, sollten Zellen mit zwei mutierten Genen keine stärkere Sensibilität zeigen, als die Zellen mit einem mutierten Gen der jeweils empfindlichsten Mutante.

b) Zellen mit zwei mutierten Genen sollten dagegen eine deutlich verstärkte Sensibilität besitzen gegenüber Zellen mit einem mutierten Gen der empfindlichsten Mutante, wenn durch die r^s-Mutationen verschiedene Reparatursysteme betroffen sind.

Da in den Untersuchungen an Doppelmutanten nachgewiesen werden konnte, daß die haploiden Doppelmutanten (r_2^s,r_{3-1}^s) und

(r_2^s,r_{3-2}^s) etwa doppelt so UV-empfindlich sind wie die Einzelmutanten r_{3-1}^s und r_{3-2}^s (ähnlich verhalten sich die entsprechenden diploiden Doppelmutanten), ist zu schließen, daß offenbar das r_2^s-Gen einen anderen Reparaturprozeß betrifft als das r_3^s-Gen mit den Allelen r_{3-1}^s und r_{3-2}^s.

Auch die verstärkte Sensibilität der homozygoten Diplonten ($r_2^s r_2^s$,$r_{3-1}^s r_{3-1}^s$) und ($r_2^s r_2^s$, $r_{3-2}^s r_{3-2}^s$) gegenüber Röntgenstrahlen, verglichen mit den homozygoten Diplonten ($r_2^s r_2^s$,++), (++,$r_{3-1}^s r_{3-1}^s$) und (++,$r_{3-2}^s r_{3-2}^s$), spricht für diese Annahme. Das r_3^s-Gen ist demnach deutlich zu unterscheiden von dem r_2^s-Gen, wodurch die Aussagen in 4.2. wiederum bestätigt werden.

Inwieweit lassen sich nun die Gene r_1^s und r_2^s voneinander unterscheiden?

Da die haploide Doppelmutante $r_1^s r_2^s$ wesentlich UV-empfindlicher ist als die haploiden Einfachmutanten r_1^s und r_2^s sind, muß angenommen werden, daß durch die r_1^s-Mutation ein anderes Reparatursystem verändert ist als durch die r_2^s-Mutation.

Ein Unterschied der beiden Gene zeigt sich z.B. auch deutlich im Sporulationsvermögen der homozygoten Diplonten: in $r_1^s r_1^s$-Diplonten ist die Sporulationsfähigkeit völlig reduziert, während $r_2^s r_2^s$-Diplonten sehr gute Sporulation zeigen. Wie in Kapitel 4.8. noch näher ausgeführt, ist auch der Einfluß der beiden Gene auf die UV-induzierte Reversionsrate (von der Isoleucin-Valin-Auxotrophie zur Prototrophie) deutlich verschieden (AVERBECK et al., 1970).

Abschließend kann hier festgestellt werden, daß durch die mutierten Gene r_1^s, r_2^s und r_3^s offenbar drei verschiedene Reparatursysteme betroffen sind. Durch r_1^s und r_2^s werden möglicherweise Systeme betroffen, die dem rec-System der Bakterien vergleichbar sind. Welches Reparatursystem Mutationen im Gen r_3^s beeinflußt, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.4. Agar-Haltungs-Reaktivierung in r^s-Stämmen

Die einzelnen r^s-Gene beeinflussen in unterschiedlicher Weise die Agar-Haltungs-Reaktivierung. Geht man von gleichen Überlebensraten nach UV-Bestrahlung aus, so bewirkt eine 48stündige Agar-Haltung

- in r^s_1, r^s_2 und r^s_{3-1}-Zellen eine deutliche Steigerung der Überlebensrate (ähnlich wie in Wildtypzellen),
- in r^s_{3-2}-Zellen dagegen eine zusätzliche Inaktivierung. Erst bei einer UV-Inaktivierung auf weniger als 1 % Überlebende zeigen auch r^s_{3-2}-Zellen eine positive AHR.

Das AHR-Vermögen der homozygoten Diplonten entspricht etwa dem der Haplonten, wobei der $r^s_2r^s_2$-Diplont eine Ausnahme darstellt, da $r^s_2r^s_2$-Zellen noch das Reaktivierungsvermögen von Wildtyp-Zellen übertreffen.

Die Untersuchungen über die Effektivität der AHR pro Zeiteinheit bei den verschiedenen r^s-Stämmen haben gezeigt, daß das AHR-Vermögen nicht immer als gleichwertig zu betrachten ist, selbst wenn abschließend nach 48 Stunden Agar-Haltung eine gesteigerte Überlebensrate festzustellen ist. So ist gemessen an der Wirksamkeit pro Zeiteinheit der AHR das AHR-Vermögen von r^s_{3-1}-Zellen stark reduziert, und die Überlebensrate nach UV-Bestrahlung wächst im Vergleich zum Wildtyp während der Agar-Haltung nur langsam (ähnlich wie in r^s_{3-2}-Haplonten und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$-Diplonten in Überlebensbereichen unter 1 % Überlebende).

Die Tatsache, daß die Mutationen r^s_{3-1} und r^s_{3-2} extreme UV-Sensibilität und gleichzeitig verminderte Wirksamkeit der AHR pro Zeiteinheit bedingen, ähnelt den Befunden über die uvr^-Mutanten von E. coli K 12. Nach GANESAN u. SMITH (1968 u. 1969) zeigen die extrem UV-sensiblen Mutanten uvr^-, die ein defektes Excision-Repair-System besitzen, eine Reduktion der Liquid-Holding-Recovery. Diese Eigenschaft der r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Stämme ist ein Hinweis dafür, daß durch die Mutationen r^s_{3-1} und r^s_{3-2} im r^s_3-Gen von Saccharomyces ein enzymatischer

Schritt innerhalb eines Excision-Repair-Systems betroffen sein kann, so daß daraus die extreme UV-Sensibilität und die reduzierte Wirksamkeit der AHR resultieren.

Man kann sich vorstellen, daß durch die Mutationen im r^s_3-Gen z.B. ein Excision-Enzym verändert sein könnte, das mit stark verminderter Aktivität

- in UV-bestrahlten r^s_{3-1}-Zellen während der Agar-Haltung noch eine pro Zeiteinheit reduzierte Ausschneidung UV-induzierter Schäden in der DNS (und damit eine Erhöhung der Überlebensrate) ermöglicht bzw.
- in UV-bestrahlten r^s_{3-2}-Zellen aufgrund eines andersartigen Defektes die Schäden in der DNS während der Agar-Haltung noch vergrößert, so daß eine Vervollständigung der Reparatur durch die nachfolgende Repair-Replication verhindert wird, was eine zusätzliche Inaktivierung zur Folge hat. In höheren Dosisbereichen bzw. in Überlebensbereichen unter 1 % Überlebende ist jedoch noch die zusätzliche Annahme notwendig, daß entweder in dem Dosisbereich andere reparierbare Schädigungen vorherrschend sind, oder daß aufgrund der Bestrahlung der Zellen in hohen Zellkonzentrationen (10^6 Zellen pro 0,1 ml Puffer) eine gegenseitige Beeinflussung der Zellen möglich ist, die eine Reaktivierung auf anderem Wege herbeiführt (UMLAUF et al., 1970).

Versuche, bei denen diploide Zellen eines $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$-Stammes mit verschiedenen UV-Dosen bei gleicher Zellkonzentration (10^5 Zellen pro 0,1 ml) bestrahlt wurden und erst nach einer anschließenden Liquid-Holding-Periode (48 Stunden) verdünnt und ausgeplattet wurden, haben inzwischen ergeben, daß der Verlauf der UV-Dosiseffektkurve und der zugehörigen Reaktivierungskurve in diesem Fall offenbar nicht von der Zellkonzentration abhängt. Vielmehr deuten diese Versuche darauf hin, daß der negative Effekt der Reaktivierung (AHR oder LHR) in den niedrigen Dosisbereichen wahrscheinlich auf einem aktiven Prozeß (vermutlich dem Excision-Repair-Prozeß) beruht, der in r^s_{3-2}-Zellen zu einer Stabilisierung der UV-induzierten Schäden führt (indem möglicherweise die Schäden zwar noch ausgeschnitten, jedoch die Schnittstellen sich während der Reaktivierungszeit so verändern, daß keine Repair-Replication mehr möglich ist). Die in den höheren Dosisbereichen bzw. in Überlebensbereichen unter 1 % Überlebenden auftretende restliche Reparaturaktivität kann durch Zusatz des

Farbstoffes Thiopyronin während der Liquid-Holding-Periode vollständig unterdrückt werden, so daß sich auch in diesem Bereich ein negativer Liquid-Holding-Effekt ergibt (UMLAUF, unveröffentlicht). Möglicherweise kann das Thiopyronin das Erkennen der in diesem UV-Dosisbereich auftretenden Schäden durch die Reparaturenzyme verhindern, oder es blockiert die Enzymaktivität bzw. die Bildung der Enzyme.

Die Befunde über das Zusammenwirken von Photoreaktivierung und nachfolgender AHR in UV-bestrahlten Wildtyp und r^s_{3-1}-Zellen, bei denen nach vollständiger PhR keine zusätzliche Erhöhung der Überlebensrate durch AHR möglich ist, sind vereinbar mit der Annahme, daß während der AHR in UV-bestrahlten Hefezellen ähnlich wie bei der Liquid-Holding-Recovery der Bakterien (CASTELLANI, JAGGER u. SETLOW, 1964) hauptsächlich UV-induzierte Pyrimidin-Dimere aus der DNS entfernt werden. Nach einer vollständigen Monomerisierung der Pyrimidin-Dimere durch die PhR ist keine Erhöhung der Überlebensrate durch AHR zu erwarten. In Zellen mit reduzierter Photoreaktivierungsfähigkeit z.B. r^s_2- oder $r^s_2 r^s_2$-Zellen erfolgt jedoch nach der PhR UV-bestrahlter Zellen noch eine weitere Steigerung der Überlebensrate durch AHR.

Es ist anzunehmen, daß aufgrund der Reduktion der PhR in diesen Zellen nicht alle UV-induzierten Pyrimidin-Dimere gespalten werden und daß die verbleibenden Dimere erst durch die AHR beseitigt werden.

Der Prozeß, der der AHR in UV-bestrahlten Hefezellen zugrundeliegt, hat demnach große Ähnlichkeit mit dem Excision-Repair-Prozeß bei Bakterien, der gleichfalls Pyrimidin-Dimere beseitigt (SETLOW u. CARRIER, 1964). Da bei den r^s_3-Mutanten die AHR pro Zeiteinheit stark reduziert ist (s. Abb. 20a), erscheint die Annahme nicht unberechtigt, daß die durch eine Mutation im r^s_3-Gen hervorgerufene Strahlensensibilität durch einen Ausfall im Excision-Repair-Prozeß verursacht wird.

Es ist charakteristisch für die AHR nach UV-Bestrahlung, daß die AHR an die Atmungskompetenz der Zellen und wahrscheinlich (genauso wie die Liquid-Holding-Recovery) an die Zufuhr chemischer Energie in Form von ATP oder Glucose gebunden ist (vgl. Befunde über LHR: PATRICK u. HAYNES, 1964 und ZIMMERMANN, 1968). Bei der Untersuchung des Reaktivierungsvermögens (bezüglich Überlebensfähigkeit und Induktion mitotischer Genkonversion) bei einem doppelt heteroallelen diploiden Saccharomyces-Stamm nach Einwirkung bestimmter Chemikalien ($NaNO_2$, Methyl-Methan-Sulfonat, Diäthyl-Sulfonat) stellte ZIMMERMANN (1968 b) fest, daß atmungsdefekte Zellen während der LHR zunehmend empfindlicher werden, wenn nicht chemische Energie (z.B. in Form von Glucose) zugeführt wird. Atmungsdefekte Zellen verbrauchen während der Puffer-Haltung (LHR) verhältnismäßig schnell ihre intrazellulären Energievorräte, so daß nur noch die Reaktionen ablaufen können, die wenig oder keine zusätzliche Energie benötigen. Der Ablauf solcher Reaktionen kann vielleicht an einer sich ändernden Wärmetönung im Kalorimeter nachgewiesen werden (vgl. LAMPRECHT, 1969).

Legt man der AHR oder der LHR (ähnlich wie bei den Bakterien) einen Excision-Repair-Prozeß zugrunde, so erscheint es möglich, daß für die Arbeit der Exo- und Endonukleasen die Energie des endogenen Stoffwechsels ausreicht, während im Stadium der Repair-Synthesis oder Replication-Repair zusätzliche Energie notwendig wird (PETTIJOHN u. HANAWALT, 1964; CERDA-OLMEDO u. HANAWALT, 1967).

Die Versuche über die AHR in atmungsdefekten und -kompetenten Wildtyp- und r^s_{3-1}-Zellen haben gezeigt, daß bei atmungsdefekten Zellen die Überlebensrate nach UV-Bestrahlung durch die Agar-Haltung teilweise gesenkt wird. Dieser negative Effekt der AHR ist besonders ausgeprägt in atmungsdefekten Wildtyp-Zellen.

Eine mögliche Erklärung dafür bietet die Annahme, daß die ersten Schritte des Excision-Repair-Prozesses während der AHR ablaufen können (analog zur LHR bei E. coli, während der UV-induzierte Pyrimidin-Dimere ausgeschnitten werden können (SETLOW u. CARRIER, 1964; SWENSON u. SETLOW, 1966)), aber die durch Wirkung der Nukleasen entstandenen DNS-Stranglücken nicht wirksam genug durch die nachfolgende Repair-Replication geschlossen werden können, da in atmungsdefekten Zellen während der 48 Stunden der Agar-Haltung die intrazellulären Energievorräte weitgehend erschöpft sind, und somit nicht mehr ausreichend Energie für die Tätigkeit der Polymerase und Ligase zur Verfügung steht.

Die zusätzliche Inaktivierung UV-bestrahlter atmungsdefekter Wildtyp-Zellen durch AHR könnte demnach auf die Aktivität von Nukleasen zurückgeführt werden, die schließlich eine Degradation der DNS zur Folge haben, da genügend Energie für die nachfolgenden Reparaturschritte fehlt.

Die weniger starke Inaktivierung UV-bestrahlter atmungsdefekter r^s_{3-1}-Zellen während der Agar-Haltung könnte dann darauf beruhen, daß eines der Excision-Enzyme in seiner Aktivität verändert ist oder gänzlich fehlt.

4.5. Dunkelreparatursysteme bei anderen Saccharomyces-Mutanten

Wenn auch die große Anzahl der Befunde über strahlensensible Mutanten und die genetische Kontrolle der Strahlensensibilität (NAKAI u. MATSUMOTO, 1967; SNOW, 1967; COX u. PARRY, 1968; RESNICK, 1968 und 1969; LASKOWSKI et al., 1968; LASKOWSKI u. AVERBECK, 1968; MOUSTACCHI, 1969; AVERBECK u. LASKOWSKI, 1969; AVERBECK et al., 1970), über die Liquid-Holding-Recovery (bzw. Dunkelhaltung, AHR usw.) (PATRICK u. HAYNES, 1964; PATRICK, HAYNES u. URETZ, 1964; MOUSTACCHI, 1969; ZIMMERMANN, 1968; RESNICK, 1968 und 1969; PARRY u. PARRY, 1969), über die Empfindlichkeit gegenüber chemischen

Agentien (KILBEY u. SMITH, 1969; ZIMMERMANN, 1968; LASKOWSKI, unveröffentlicht), über UV-induzierte Mutationen (MOUSTACCHI, 1969; SNOW, 1968; RESNICK, 1969; ECKARDT, 1970; AVERBECK et al., 1970; ZAKHAROV et al., 1970) und über Rekombination (SNOW, 1968; RODARTE, FOGEL u. MORTIMER, 1968) wesentliche Hinweise auf die Existenz wirksamer Dunkelreparaturmechanismen in Hefen analog zu denen der Bakterien ergeben haben, fehlt doch in fast allen Fällen der direkte biochemische Nachweis.

Ein bemerkenswerter Sonderfall ist der Nachweis, daß ein Wildtyp-Saccharomyces-Stamm UV-induzierte Pyrimidin-Dimere aus der DNS entfernen kann, während z.B. eine strahlensensible Mutante mit dem uvs 2 Gen (beschrieben von COX u. PARRY, 1968) nicht dazu in der Lage ist (UNRAU, 1969). Das zeigt, daß Hefen offensichtlich ein Excision-Repair-System analog zu den Bakterien besitzen.

Da das r_3^s-Gen mit dem uvs 2 Gen identisch ist, folgt, daß die Mutanten mit den Allelen r_{3-1}^s und r_{3-2}^s gleichfalls im Excision-Repair-System defekt sind. Damit ist auch direkt nachgewiesen, daß die Mutationen im r_3^s-Gen uvr^-Charakter haben.

4.6. Fähigkeit zur Auslösung UV-induzierter Mutationen

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse (AVERBECK et al., 1970) haben gezeigt, daß die r^s-Mutationen einen deutlichen Einfluß auf UV-induzierte Mutationsraten haben. So haben sich bei der Untersuchung UV-induzierter Reversionshäufigkeiten von der Isoleucin-Valin-Auxotrophie zur Prototrophie verglichen mit Wildtyp-Zellen

- für r_1^s-Zellen erhöhte Raten,
- für r_2^s-Zellen stark reduzierte Raten,
- für r_{3-1}^s-Zellen keine Revertanten (auch nicht in unbestrahlten Kontrollen) und
- für r_{3-2}^s-Zellen stark erhöhte Raten ergeben.

RESNICK (1968 und 1969 b) hat in den Mutanten mit dem uvs 9 Gen (das mit dem r_3^s-Gen identisch ist) gleichfalls erhöhte UV-induzierte Mutationsraten im Vergleich zum Wildtyp gefunden.

Aus Untersuchungen über die UV-induzierte Mutationsauslösung in Mutanten von E. coli mit rec⁻Charakter (z.B. exr⁻ Stämme) geht hervor, daß Mutationen wahrscheinlich hauptsächlich durch Fehler in rec-System (Post-Replication-Repair-System) entstehen (BRIDGES, DENNIS u. MUNSON, 1967; WITKIN, 1969 a u. b). Daraus folgt, daß in Stämmen mit einem defekten Post-Replication-Repair-System durch UV-Bestrahlung praktisch keine Mutationen ausgelöst werden können (unabhängig davon, ob das Excision-Repair-System noch intakt ist, oder nicht) (WITKIN, 1967; WITKIN, 1969 b). Die stark reduzierte Reversionsrate in r_2^s-Zellen nach UV-Bestrahlung kann daher auch als Hinweis dafür gewertet werden, daß r_2^s-Zellen einen rec⁻Charakter besitzen. Der Befund, daß r_1^s-Zellen im Gegensatz zu r_2^s-Zellen nach UV-Bestrahlung eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Mutationsrate zeigen, weist darauf hin, daß die r_1^s-Mutation, wie in 4.2. und 4.3. ausgeführt, wahrscheinlich ein anderes Reparatursystem als die r_2^s-Mutation betrifft, obwohl dieses andere System mehr Ähnlichkeit mit einem rec-System als mit einem Excision-Repair-System hat.

Eine ähnliche Erhöhung der Mutationsrate wie in UV-bestrahlten r_{3-2}^s-Zellen wurde in bestimmten excision-defekten hcr⁻ Stämmen von E. coli nachgewiesen (HILL, 1965; WITKIN, 1966 a u. b). Das kann als weiterer Hinweis dafür gesehen werden, daß tatsächlich r_{3-2}^s-Zellen im Excision-Repair-System defekt sind. Der Befund, daß in r_{3-1}^s-Zellen jedoch keine Revertanten nach UV-Bestrahlung gefunden wurden, bedarf noch einer näheren Untersuchung. Zunächst ist es nicht möglich, zwischen zwei Alternativen zu unterscheiden:

- entweder vermögen die r_{3-1}^s-Zellen trotz der geringen AHR-Effektivität (vgl. 3.3.4.1.5.) während der Teilungsverzögerung, die durch Aufbringen der UV-bestrahlten Zellen auf Minimalmedium hervorgerufen wird, vollständiger noch als Wildtyp-Zellen die induzierten DNS-Schäden zu reparieren,

- oder alle UV-induzierten mutativen Veränderungen der DNS führen infolge fehlender Reparaturmöglichkeiten zum Tod der Zellen, und es überleben nur Zellen, in denen keine Schäden in der DNS gesetzt wurden. Letztere Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß in r^s_{3-1}-Zellen auch die spontanen Mutationsraten bis auf einen nicht nachweisbaren Wert reduziert sind (AVERBECK et al., 1970).

4.7. Sporulationsvermögen der homozygoten Diplonten ($r^s r^s$)

In den homozygoten diploiden Stämmen mit den Allelen r^s_{3-1} und r^s_{3-2} ist das Sporulationsvermögen vollständig reduziert. Offensichtlich spielen die enzymatischen Schritte innerhalb des Excision-Repair-Prozesses, die aufgrund der r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Mutation verändert sind, für den Ablauf der Meiose eine wesentliche Rolle. In welchem Stadium der Meiose der weitere Ablauf blockiert ist, kann möglicherweise auf dem Wege über cytologische Untersuchungen erkannt werden (TAMAKI, 1965).

Von einer reduzierten Sporulation im Zusammenhang mit bestimmten uvs oder xs-Genen bei strahlensensiblen Mutanten der Hefe (COX u. PARRY, 1968; RESNICK, 1968) und anderen Pilzen wie Ustilago, Aspergillus und Neurospora (HOLLIDAY, 1967; LANIER, TUVESON u. LENNOX, 1968; CHANG u. TUVESON, 1968) wurde verschiedentlich berichtet. Vielfach wurde dabei angenommen, daß der Prozeß der Rekombination während der Meiose aufgrund der Mutationen verändert sein könnte (COX u. PARRY, 1968), nachdem HOLLIDAY (1967) in einem homozygoten diploiden Stamm mit dem uvs 2 Gen bei Ustilago gezeigt hatte, daß die mitotische Rekombination und die Sporulation gleichzeitig gehemmt sind.

In diesem Zusammenhang ist der unterschiedliche Einfluß der Mutationen r^s_1 und r^s_2 auf das Sporulationsvermögen bemerkenswert, da beide Mutationen einen gewissen rec$^-$Charakter zeigen (s. 4.2. u. 4.3.). Da das Sporulationsvermögen des homozygoten $r^s_2 r^s_2$-Diplonten durch die r^s_2-Mutation nicht beeinträchtigt wird, muß angenommen werden, daß durch diese Mutation ein Schritt in einem Reparatursystem betroffen ist, der den Ablauf der Meiose nicht beeinflußt. Der vollständige

Verlust der Sporulationsfähigkeit des $r_1^s r_1^s$-Diplonten hingegen ist ein Hinweis dafür, daß die r_1^s-Mutation entscheidenden Einfluß auf die Sporulation hat. Diese Befunde sind vereinbar mit Angaben von RESNICK (1969), die darauf schließen lassen, daß der rec⁻Charakter bestimmter strahlensensibler Mutanten der Hefe nicht immer ein gestörtes Sporulationsvermögen zur Folge haben muß. Obwohl z.B. die Gene xs 2 und xs 3 (beschrieben von RESNICK (1968) mit bestimmten Genen rekombinationsdefekter Mutanten (RODARTE, FOGEL u. MORTIMER, 1968) identisch sind (RESNICK, 1969), ist die Sporulation nur in den homozygoten Diplonten mit dem xs 3 Gen blockiert,nicht jedoch in den xs 2,xs 2 Diplonten. Möglicherweise weist der unterschiedliche Einfluß der Mutationen r_1^s und r_2^s (bzw. xs 3 und xs 2) mit rec⁻ Charakter auf das Sporulationsvermögen auf die Existenz von zwei verschiedenen rec-Systemen bei der Hefe hin:

- ein System, das sich in gestörtem Zustand z.B. durch die Mutationen r_1^s (oder xs 3)hemmend auf die Sporulationsfähigkeit der homozygoten Diplonten auswirkt, und
- ein anderes System, das auch in verändertem Zustand (z.B. durch die Mutationen r_2^s oder xs 2) keinerlei Einfluß auf die Sporulation hat.

Diese Hypothese, daß durch die Mutationen r_1^s und r_2^s zwei verschiedene Reparatursysteme betroffen sind, wird unterstützt durch die Befunde über die Strahlensensibilität des haploiden Doppelmutanten $r_1^s r_2^s$ und die unterschiedliche Fähigkeit zur Auslösung UV-induzierter Mutationen, aus denen gleichfalls auf das Vorhandensein zweier Reparatursysteme geschlossen werden kann (s. 4.3. und 4.6.).

4.8. Zusammenfassende Charakterisierung der r^s-Mutationen und Vergleich mit den uvr⁻ und rec⁻Mutationen bei Bakterien

Die Untersuchungen an strahlensensiblen Mutanten von Saccharomyces haben gezeigt, daß die r^s-Stämme teilweise ähnliche Eigenschaften besitzen wie die uvr⁻ oder rec⁻Mutanten von E. coli K 12 (HOWARD-FLANDERS u. BOYCE, 1966):

1a) Die deutliche Sensibilität der haploiden und diploiden Stämme mit dem r_2^s oder dem r_1^s-Gen gegenüber Röntgen- und UV-Bestrahlung läßt sich ähnlich wie bei den rec$^-$ Mutanten von E. coli K 12 mit dem Ausfall eines enzymatischen Reparaturprozesses erklären, der in ungestörtem Zustand rekombinationsartige Reparaturvorgänge nach Art des Post-Replication-Repair-Prozesses ermöglicht.

b) Die extreme UV-Sensibilität der haploiden und homozygoten diploiden Stämme mit den Allelen r_{3-1}^s und r_{3-2}^s ist ähnlich wie die extreme UV-Sensibilität der uvr$^-$Mutanten von E. coli K 12 auf den Ausfall eines Excision-Repair-Systems zurückzuführen.

2. Ähnlich wie das rec$^-$Gen (rec A) zusammen mit einem uvr$^-$ Gen in Doppelmutation bei E. coli einen zusätzlichen Sensibilitätseffekt gegenüber UV (um einen Faktor von etwa 40) verursacht (HOWARD-FLANDERS et al., 1966), bewirkt das r_2^s-Gen zusammen mit dem r_{3-1}^s oder r_{3-2}^s-Allel in Doppelmutation eine deutliche Steigerung der UV-Sensibilität (um den Faktor 2). Vergleichbare supersensible Doppelmutanten von Saccharomyces sind auch von NAKAI u. MATSUMOTO (1967) und BRENDEL, KHAN u. HAYNES (1969) beschrieben worden.

   Aus der stärkeren UV-Sensibilität der haploiden Doppelmutante $r_1^s r_2^s$ im Vergleich zu den haploiden Einzelmutanten r_1^s und r_2^s muß geschlossen werden, daß durch die Mutationen r_1^s und r_2^s voneinander verschiedene Reparatursysteme verändert sind.

3a) Nach GANESAN u. SMITH (1968 u. 1969) zeigen rec$^-$Stämme von E. coli K 12, die gleichzeitig uvr$^+$ sind, d.h. ein intaktes Excision-Repair-System besitzen, gute Liquid-Holding-Recovery. Ähnlich ist wahrscheinlich das gute AHR-Vermögen der r_2^s und r_1^s-Stämme zu verstehen. Da vermutlich in diesen Stämmen das Excision-Repair-System nicht verändert ist, folgt daraus das gute AHR-Vermögen.

b) Die Reduktion der Wirksamkeit der AHR pro Zeiteinheit

in r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Zellen ist wahrscheinlich ähnlich wie die Reduktion des LHR-Vermögens in excision-defekten uvr⁻Zellen von E. coli K 12 auf den teilweisen Verlust des Excision-Repair-Vermögens zurückzuführen (GANESAN u. SMITH, 1968 u. 1969).

4a) In r^s_2-Zellen wurde nach UV-Bestrahlung eine stark reduzierte Reversionsrate (von der Isoleucin-Valin-Auxotrophie zur Prototrophie) im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (AVERBECK et al., 1970). Auch das ist ein Hinweis dafür, daß r^s_2-Zellen einen rec⁻Charakter haben. Die Untersuchungen über die UV-induzierte Mutationsauslösung bei E. coli rec⁻Stämmen mit rec⁻Charakter haben gezeigt, daß in Stämmen mit einem defekten Post-Replication-Repair-System (rec-System) durch UV-Bestrahlung keine Mutationen induziert werden können. Die erhöhte Mutationsrate (im Vergleich zum Wildtyp) in r^s_1-Zellen nach UV-Bestrahlung ist vermutlich damit zu erklären, daß durch die r^s_1-Mutation ein anderes Reparatursystem (rec-System) als in r^s_2-Zellen verändert ist (s. 4.3.).

b) UV-bestrahlte r^s_{3-2}-Zellen zeigen ähnlich wie bestimmte excision-defekte hcr⁻Stämme bei E. coli eine stark erhöhte Mutationsrate (WITKIN, 1966). Dieser Befund weist darauf hin, daß in r^s_{3-2}-Zellen wahrscheinlich das Excision-Repair-System verändert ist. Worauf die völlige Reduktion der Reversion nach UV-Bestrahlung (und ohne vorherige Bestrahlung) in r^s_{3-1}-Zellen beruht, ist noch ungeklärt.

5a) Der Verlust der Sporulationsfähigkeit in $r^s_1 r^s_1$-Diplonten und das gute Sporulationsvermögen des $r^s_2 r^s_2$-Diplonten ist möglicherweise auf die Existenz zweier verschiedener rec-Systeme zurückzuführen, wobei das eine Reparatursystem (durch die r^s_1-Mutation verändert) den Ablauf der Sporulationsprozesse hemmt, das andere (durch die r^s_2-Mutation verändert) jedoch nicht.

b) Aus der vollständigen Reduktion der Sporulationsfähig-

keit der Diplonten $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$ und $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$ läßt sich schließen, daß die enzymatischen Schritte, die als Folge der r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Mutation innerhalb des Excision-Repair-Systems ausgefallen sind, entscheidend für den Ablauf der Sporulationsprozesse sind.

Um eindeutig zu beweisen, ob es sich bei den Genen r^s_1 und r^s_2 tatsächlich um Mutationen handelt, die den rec$^-$Mutationen der Bakterien entsprechen, ist allerdings eine umfassende Analyse des Rekombinationsvermögen der homozygoten r^s_1 und r^s_2-Diplonten notwendig. Diese steht noch aus.

Trotz vieler Gemeinsamkeiten in der Strahlensensibilität der strahlensensiblen Mutanten und im Reaktivierungsvermögen bestehen zwischen Hefen und Bakterien doch folgende Unterschiede:

a) Multi-Locus-Kontrolle der Strahlensensibilität bei der Hefe (wenigstens 28 verschiedene Gene (s. Tabelle XI) gegenüber 6 - 10 Genen bei E. coli)

b) Strahlensensibilität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp geringer bei Hefen als bei Bakterien:
Dosisreduktionsfaktor (UV-Licht):
bei der Hefe: 20 - 30
bei E. coli: 50 - 100

Dosisreduktionsfaktor (Röntgenstrahlen):
bei der Hefe: 1,5 - 2,0
bei E. coli: 4 - 6

Ein ähnliches Verhältnis der Dosisreduktionsfaktoren findet sich auch bei den Doppelmutanten:
Dosisreduktionsfaktor (UV-Licht):
bei der Hefe (r^s_2,r^s_{3-2} und X^s_1,UV^s_1): 43 - 80
bei E. coli (uvr$^-$, rec$^-$): bis 2000

Dosisreduktionsfaktor (Röntgenstrahlen):
bei der Hefe (X^s_1, UV^s_1): 1,6 - 2,0
bei E. coli (uvr$^-$, rec$^-$): 3 - 6

(Angaben n. NAKAI u. MATSUMOTO, 1967; SNOW, 1967; COX u.

PARRY, 1968; RESNICK, 1968; MOUSTACCHI, 1969; ZAKHAROV et al., 1970; AVERBECK et al., 1970 und HOWARD-FLANDERS u. BOYCE, 1966).

c) Das Reaktivierungsvermögen bei Hefen ist allgemein geringer als bei Bakterien (PARRY u. PARRY, 1969):
Photoreaktivierung:

Dosismodifikationsfaktor:
bei der Hefe : 2,1 (bzw. n. PARRY u. PARRY, 1969: 1,3)
bei E. coli B/r: 2,5

Dunkelreaktivierung (Liquid-Holding-Recovery, AHR etc.):

Dosismodifikationsfaktor:
bei der Hefe gering verglichen
mit den Bakterien

Dauer der Reaktivierung:
bei Hefen: mehrere Tage (2 - 8)
bei E. coli: wenige Stunden (4 - 8 Std.
n. RUPERT u. HARM, 1966)

d) Im Gegensatz zu den Bakterien gibt es bei den Hefen röntgensensible Stämme (RESNICK 1968 u. 1969), die nicht gleichzeitig UV-sensibel sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Nach Einwirkung von 1-Nitro-3-nitroso-1-methylguanidin auf Zellen des haploiden Stammes 211-1aM (Wildtyp) von Saccharomyces wurden insgesamt 134 meist schwach strahlensensible Mutanten (9 UV-sensibel, 59 röntgensensibel und 66 UV- und röntgensensibel) isoliert. Drei ausgeprägt UV- und röntgensensible Mutanten wurden davon näher untersucht, wobei zum Vergleich die von LASKOWSKI et al. (1968) beschriebene Mutante 1930 mit dem r_1^s-Gen (r^s = "radiation sensitive") herangezogen wurde.

Die genetische Analyse von diploiden Hybridstämmen, die aus geeigneten Kreuzungen (des Typs: Mutante X Wildtyp) hervorgegangen waren, ergab, daß der Strahlensensibilität je-

weils frei mendelnde, rezessiv wirkende mutierte Gene zugrundeliegen. Mit Hilfe der Tetradenanalyse bei diploiden Stämmen, heterozygot für jeweils zwei der Mutationen, und durch Komplementationstests konnten in den drei Mutanten zwei mutierte Gene r_2^s und r_3^s identifiziert werden, die für die Strahlensensibilität gegenüber UV- und Röntgenstrahlen verantwortlich sind und nicht eng gekoppelt vorliegen.

Im r_3^s-Gen, das centromer-gekoppelt ist, sind zwei Allele r_{3-1}^s und r_{3-2}^s unabhängig voneinander mutiert. Komplementationstests zeigten, daß das r_3^s-Gen mit den Genen uvs 2, uvs 9 und uvr 9, die von COX u. PARRY (1968), RESNICK (1968) und SNOW (1967) beschrieben worden sind, identisch ist.

Zusammen mit den in der Literatur beschriebenen Genen ergibt sich, daß bei Saccharomyces mindestens 19 Gene die Empfindlichkeit gegenüber UV, 3 Gene die Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen und 6 Gene die Empfindlichkeit gegenüber UV- und Röntgenstrahlen kontrollieren.

Die Allele r_{3-1}^s und r_{3-2}^s sorgen in homozygoten Diplonten für eine völlige Reduktion des Sporulationsvermögens, während das r_2^s-Gen die Sporulation des $r_2^s r_2^s$-Diplonten nicht beeinträchtigt.

Das r_2^s-Gen bewirkt (ähnlich wie das r_1^s-Gen) in haploiden und homozygoten diploiden Stämmen eine deutliche, mittlere Sensibilität gegenüber UV- und Röntgenstrahlen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Haplonten und Diplonten.

Haploide und homozygote diploide Stämme, die das mutierte Allel r_{3-1}^s oder r_{3-2}^s enthalten, sind extrem UV-empfindlich. Die Haplonten r_{3-1}^s und r_{3-2}^s zeigen eine mittlere Röntgenempfindlichkeit, die entsprechenden homozygoten Diplonten $r_{3-1}^s r_{3-1}^s$ und $r_{3-2}^s r_{3-2}^s$ erweisen sich jedoch ähnlich resistent gegenüber Röntgenstrahlen wie der Wildtyp-Diplont.

In den haploiden Doppelmutanten r_2^s, r_{3-1}^s und r_2^s, r_{3-2}^s ist

die UV-Sensibilität gegenüber den haploiden Einzelmutanten r^s_{3-1} und r^s_{3-2} etwa um den Faktor 2 erhöht. Eine ähnliche Steigerung der UV-Sensibilität in Anwesenheit des r^s_2-Gens wurde auch bei den doppelt homozygoten diploiden Mutanten $r^s_2r^s_2$, $r^s_{3-1}r^s_{3-1}$ und $r^s_2r^s_2$, $r^s_{3-2}r^s_{3-2}$ festgestellt. Gegenüber Röntgenstrahlen wurde in den doppelt homozygoten Diplonten (nicht in den haploiden Doppelmutanten) eine gesteigerte Sensibilität nachgewiesen gegenüber dem röntgensensiblen homozygoten $r^s_2r^s_2$-Stamm.

Die r^s-Gene beeinflussen in haploiden und homozygoten diploiden Zellen unterschiedlich das Reaktivierungsvermögen nach UV-Bestrahlung:

a) Dunkelreaktivierung:

Ähnlich wie in Wildtypzellen wird in UV-bestrahlten haploiden r^s_2 und r^s_{3-1}-Zellen (und entsprechenden diploiden Zellen) eine gesteigerte Überlebensrate durch die Agar-Haltung erreicht. In UV-bestrahlten haploiden (und diploiden) Zellen mit dem r^s_{3-2}-Allel erfolgt jedoch durch Agar-Haltung eine zusätzliche Inaktivierung, erst bei Überlebensraten von weniger als 1 % Überlebende nach UV-Bestrahlung steigt die Überlebensrate während der Agar-Haltung an.

Während die AHR in UV-bestrahlten r^s_2-Zellen mit ähnlicher Wirksamkeit pro Zeiteinheit wie im Wildtyp abläuft (in $r^s_2r^s_2$-Zellen sogar noch wirksamer als im Wildtyp-Diplont), ist die Wirksamkeit pro Zeiteinheit der AHR in UV-bestrahlten r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Zellen (in letzteren bei Überlebensraten unter 1 % Überlebende) stark reduziert.

b) Photoreaktivierung (PhR):

Das PhR-Vermögen ist bei haploiden und homozygoten diploiden Stämmen mit den Allelen r^s_{3-1} oder r^s_{3-2} ungestört (wie im Wildtyp) erhalten.
r^s_2-Haplonten und $r^s_2r^s_2$-Diplonten zeigen jedoch (ähnlich wie Stämme mit dem r^s_1-Gen) eine etwas reduzierte PhR-Fähigkeit.

c) Zusammenwirken von PhR und AHR:

In UV-bestrahlten r^s_{3-1}-Zellen und in Wildtyp-Zellen kann nach maximaler PhR (60 Minuten Belichtung) durch anschließende Agar-Haltung keine zusätzliche Erhöhung der Überlebensrate erzielt werden. Aus dieser Überlappung der Effekte von PhR und AHR wird geschlossen, daß die AHR ähnlich wie die Liquid-Holding-Recovery UV-induzierte Pyrimidin-Dimere (das Substrat für die PhR) beseitigen kann. In UV-bestrahlten r^s_2-Zellen mit reduzierter PhR-Fähigkeit ist nach PhR noch ein zusätzlicher Effekt durch anschließende AHR möglich.

Aus den Eigenschaften der r^s-Mutanten wird geschlossen, daß bei Saccharomyces wenigstens drei verschiedene Dunkelreparatursysteme für Strahlenschäden an der DNS vorhanden sein müssen:

1. ein "Excision-Repair-System" (analog zu den Bakterien), dessen Ausfall in r^s_{3-1} und r^s_{3-2}-Zellen (ähnlich wie in den excision-defekten uvr$^-$Mutanten von E. coli K 12) extreme UV-Sensibilität und reduziertes AHR-Vermögen bedingt.

2. ein "Post-Replication-Repair-System" (ähnlich, wie das der Bakterien), das in r^s_2-Zellen verändert ist und die deutliche Sensibilität gegenüber Röntgenstrahlen in Haplonten und homozygoten Diplonten (und eine mittlere UV-Sensibilität) zur Folge hat. Ähnlich wie die rec-Gene von E. coli in Doppelmutation mit uvr-Genen hat auch das r^s_2-Gen in Doppelmutation mit r^s_{3-1} oder r^s_{3-2} eine stark sensibilisierende Wirkung gegenüber UV-Bestrahlung. Die r^s_2-Mutation hat keinen Einfluß auf das AHR-Vermögen, vermutlich da das Excision-Repair-System in r^s_2-Zellen noch intakt ist, und sie bewirkt in homozygoten $r^s_2 r^s_2$-Diplonten keine Änderung der Sporulationsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp.

3. ein Reparatursystem, das in r^s_1-Zellen verändert ist. Wie das in r^s_2-Zellen betroffene System hat es Ähnlichkeiten

mit dem rec-System in Bakterienzellen, unterscheidet sich jedoch von dem r_2^s-System durch den starken Einfluß auf das Sporulationsvermögen (Reduktion der Sporulationsfähigkeit in $r_1^s r_1^s$-Diplonten).
Ein Hinweis dafür, daß in r_1^s-Zellen ein anderes rec-System betroffen ist als in r_2^s-Zellen, ist darin zu sehen, daß die haploide Doppelmutante $r_1^s r_2^s$ wesentlich UV-sensibler ist als die Einzelmutanten r_1^s oder r_2^s.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ADLER, H.I. (1966) — The genetic control of radiation sensitivity in microorganisms. In: Advances in Radiation Biology 2, 167-192, L.G. AUGENSTEIN, R. MASON u. M. ZELLE, (ED.), Academic Press, New York

ALPER, T. u. N.E. GILLIES (1960) — The relationship between growth and survival after irradiation of Escherichia coli strain B and two resistant mutants. J.Gen. Microbiol. 22, 113-128

AVERBECK, D. u. W. LASKOWSKI (1969) — Mutants of Saccharomyces lacking the ability for short and long-time repair processes. In: Informationen zur Kernforschung und Kerntechnik 10, ZAED, Karlsruhe, 10-1112, AED-Conf. 69-195-012

AVERBECK, D., W. LASKOWSKI, F. ECKARDT u. E. LEHMANN-BRAUNS (1970) — Four radiation sensitive mutants of Saccharomyces. Molec.Gen. Genetics 107, 117-127

BENATHEN, J.A. u. C.A. BEAM (1969) — X-ray inactivation and its repair in normal and mutant yeast cells. Abstr. Biophys. Soc. 10, FAM-L9

BEUKERS, R. u. W. BERENDS (1960) — Isolation and identification of the irradiation product of thymine. Biochim. Biophys. Acta 41, 550-551

BILLEN, D., R.R. HEWITT, T. LAPTHISOPHON u. P.M. ACHEY (1967)
Deoxyribunucleic acid repair replication after ultraviolet light or X-ray exposure of bacteria. J.Bacteriol. 94, 1538-45

BÖHME, H. (1967)
Genetic instability of an ultraviolet-sensitive mutant of Proteus mirabilis. Biochem.Biophys.Res.Commun. 28, 191-196

von BORSTEL, R.C. (1969)
Yeast Genetics. Science 163, 962-964

BOYCE, R.P. u. P. HOWARD-FLANDERS (1964a)
Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E. coli K 12. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 51, 293-300

BOYCE, R.P. u. P. HOWARD-FLANDERS (1964b)
Genetic control of DNA breakdown and repair in E. coli K 12 treated with Mitomycin C or ultraviolet light. Z.Vererbungsl. 95, 345-350

BRENDEL, M., N.A. KHAN u. R.H. HAYNES (1969)
Genetic control of resistance to radiation and alkylation in yeast: supersensitive double mutants. Abstr.Biophys.Soc. 10, FAM-L8

BRIDGES, B.A., R.E. DENNIS u. R.J. MUNSON (1967)
Differential induction and repair of ultraviolet damage leading to true reversions and external suppressor mutation of an ochre codon in Escherichia coli B/r WP2. Genetics, 57, 897-908

BRIDGES, B.A. u. R.J. MUNSON (1966)
Excision-repair of DNA damage in an auxotrophic strain of Escherichia coli. Biochem.Biophys.Res.Commun. 22, 268-273

BRUNK, C.F. u. P.C. HANAWALT (1967)
Repair of damaged DNA in an eucaryotic cell: Tetrahymena pyriformis. Science 158, 663-664

BRUNK, C.F. u. P.C. HANAWALT (1969)
The nature of the excision-repair region in the DNA from an eucaryotic organism, Tetrahymena pyriformis. Radiation Res. 38, 285-295

CASTELLANI, A., J. JAGGER u. R.B. SETLOW (1964)
Overlap of photoreactivation and liquid holding recovery in Escherichia coli B. Science 143, 1170-1171

CERDA-OLMEDO, E. u. P.C. HANAWALT (1967)
Macromolecular action of NNMG in E. coli. Biochim.Biophys.Acta 142, 450-464

CHANG, L.T. u. R.W. TUVESON (1967)
Ultraviolet-sensitive mutants in Neurospora crassa. Genetics 56, 801-810

CLARK, A.J. (1967)
The beginning of a genetic analysis of recombination proficiency. J.Cellular Physiol. 70 Suppl. 1, 165-180

CLARK, A.J. u. A.D. MARGULIES (1965)
Isolation and characterization of recombination deficient mutants of E. coli K 12. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 53, 451-459

CLEAVER, J.E. (1968)
Repair replication and degradation of Bromuracil-substituted DNA in mammalian cells after irradiation with ultraviolet light. Biophys.J. 8, 775-791

CLEAVER, J.E. u. R.B. PAINTER (1968) — Evidence for repair replication of Hela cell DNA damaged by ultraviolet light. Biochim.Biophys.Acta 161, 552

COOK, J.S. (1967) — Direct demonstration of the monomerization of thymine-containing dimers in U.V.-irradiated DNA by yeast photoreactivating enzyme and light. Photochem.Photobiol. 6, 97-101

COX, B.S. u. J.M. PARRY (1968) — The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet light-sensitive mutants in yeast. Mutation Res. 6, 37-55

DAVIES, D.R. (1967a) — The control of dark repair mechanisms in meiotic cells. Molec.Gen.Genetics 100, 140-149

DAVIES, D.R. (1967b) — UV-sensitive mutants of Chlamydomonas reinhardi. Mutation Res. 4, 765-770

DELLWEG, H.W. u. A. WACKER (1962) — Strahlenchemische Veränderungen von Thymin und Cytosin in der DNS durch UV-Licht. Z. Naturforschg. 17b, 827-834

DENHARDT, D.T., D.H. DRESSLER u. A. HATHAWAY (1967) — The abortive replication of X 174 DNA in a recombination deficient mutant of Escherichia coli. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57, 813-820

ECKARDT, F. (1970) — UV-induzierte Mutationsraten bei strahlensensiblen und -resistenten Hefestämmen. Staatsexamensarbeit, Wiss.Landesprüfungsamt, Berlin

ELLISON, S.A., R.R. FEINER u. R.F. HILL (1960)
A host effect on bacteriophage survival after ultraviolet irradiation.
Virology 11, 294-296

EMEIS, C.C. u. H. GUTZ (1958)
Eine einfache Technik zur Massenisolation von Hefesporen.
Z.Naturforschg. 13b, 647-650

EMMERSON, P.T. (1968)
Recombination deficient mutants of Escherichia coli K 12 that map between thy A and arg A.
Genetics 60, 19-30

ESSER, K. u. R. KUENEN (1965)
Genetik der Pilze
Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York

GANESAN, A.K. u. K.C. SMITH (1968)
Dark recovery processes in Escherichia coli irradiated with ultraviolet light, I. Effect of rec⁻ mutations on liquid holding recovery.
J.Bacteriol. 96, 365-373

GANESAN, A.K. u. K.C. SMITH (1969)
Dark recovery processes in Escherichia coli irradiated with ultraviolet light, II. Effect of uvr genes on liquid holding recovery.
J.Bacteriol. 97, 1129-1133

GATES, F.L. (1928)
On nuclear derivatives and the lethal action of ultra-violet light.
Science 68, 479-480

GEFTER, M.L., A. BECKER u. J. HURWITZ (1967)
The enzymatic repair of DNA, I. Formation of circular DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 58, 240-255

GEORGIEV, G.P. (1969)
Histones and the control of gene action.
Ann.Rev.Gen. III, 155-180

GIESE, A.C. (1968)
Ultraviolet action spectra in perspective with special reference to mutation.
Photochem.Photobiol. 8, 527-546

GREER, S. u. S. ZAMENHOF (1957)
Effect of 5-Bromuracil in deoxyribonucleic acid of E. coli on sensitivity to ultraviolet irradiation.
Abstr.Amer.Chem.Soc. 131 st Meeting, 3 C

HAEFNER, K. u. L. HOWREY (1967)
Gene-controlled UV-sensitivity in Schizosaccharomyces pombe.
Mutation Res. 4, 219-221

HANAWALT, P.C. (1968)
Cellular recovery from photochemical damage.
Photophysiology, IV, 203-251
A.C. Giese, Academic Press, New York

HANAWALT, P.C. u. R.H. HAYNES (1967a)
The repair of DNA.
Sci.Am. 216, 36-43

HANAWALT, P.C. u. R.H. HAYNES (1967b)
Reparatur schadhafter Desoxyribonucleinsäure.
Umschau 17, 553-559

HARM, W. (1968)
Recovery of UV-inactivated E. coli cells by the v-gene action of phage T_4.
Mutation Res. 6, 175-179

HARM, W. u. B. HILLEBRANDT (1962)
A non-photoreactivable mutant of E. coli B.
Photochem.Photobiol. 1, 271-272

HAYNES, R.H. (1964) — Role of DNA repair mechanisms in microbial inactivation and recovery phenomena. Photochem.Photobiol. 3, 429-450

HAYNES, R.H. (1966) — The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena. Radiation Res.Suppl. 6, 1-29

HAYNES, R.H., R.M. BAKER u. G.E. JONES (1968) — Genetic implications of DNA repair. In: Energetics and Mechanisms in Radiation Biology, 425-465, G.O. Philip, Academic Press, London

HEMPEL, S. u. W. LASKOWSKI (1964) — Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. VII. Vergleichende Untersuchung Strahlen- und Bernsteinsäureperoxyd- induzierter Atmungs-, Gärungs- und Knospungshemmungen. Z.Naturforschg. 19b, 929-935

HILL, R.F. (1958) — A radiation sensitive mutant of Escherichia coli. Biochim.Biophys.Acta 30, 636-637

HILL, R.F. (1965) — Ultraviolet-induced lethality and reversion to prototrophy in Escherichia coli strains with normal and reduced dark repair ability. Photochem.Photobiol. 4, 563-568

HOLLAENDER, A. u. W.D. CLAUS (1936) — The bactericidal effect of ultraviolet radiation on Escherichia coli in liquid suspensions. J.Gen.Physiol. 19, 753-765

HOLLAENDER, A. u. C.W. EMMONS (1941) — Wavelength dependence of mutation production in the ultraviolet with special emphasis on fungi. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 9, 179-185

HOLLIDAY, R. (1965)
Radiation sensitive mutants of Ustilago maydis.
Mutation Res. 2, 557-559

HOLLIDAY, R. (1967)
Altered recombination frequencies in radiation sensitive strains of Ustilago.
Mutation Res. 4, 275-288

HOWARD-FLANDERS, P. (1968)
DNA repair.
Ann.Rev.Biochem. 37, 175-200

HOWARD-FLANDERS, P., R.P. BOYCE, E. SIMSON u. L. THERIOT (1962)
A genetic locus in E. coli K 12 that controls the reactivation of UV-photoproducts assoziated with thymine in DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 48, 2109-2115

HOWARD-FLANDERS, P. u. R.P. BOYCE (1965)
The repair of ultraviolet photoproducts in DNA of bacteria.
Cell.Radiation Biology, 52-63
Williams and Wilkins Comp., Baltimore

HOWARD-FLANDERS, P.u. R.P. BOYCE (1966)
DNA repair and genetic recombination: Studies on mutants of Escherichia coli defective in these processes.
Radiation Res.Suppl. 6, 156-184

HOWARD-FLANDERS, P.u. L. THERIOT (1966a)
Three loci in E. coli K 12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA.
Genetics 53, 1119-1136

HOWARD-FLANDERS, P.u. L. THERIOT (1966b)
Mutants of Escherichia coli K 12 defective in DNA repair and in genetic recombination.
Genetics 53, 1137-1150

JAGGER, J. (1960)
Photoprotection from ultraviolet killing in Escherichia coli B. Radiation Res. 13, 521-539

JAGGER, J., W.C. WISE u. R.S. STAFFORD (1964)
Delay in growth and division induced by near UV-irradiation in E. coli B and its role in photoprotection and liquid holding recovery. Photochem.Photobiol. 3, 11-24

JAGGER, J. u. R.S. STAFFORD (1965)
Evidence for two mechanisms of photoreactivation in Escherichia coli B. Biophys.J. 5, 75-88

JANNSEN, S. u. W. LASKOWSKI (1967)
Die Wirkung von Ultraschall auf die O_2-Aufnahme und die anaerobe CO_2-Abgabe von Hefezellen. Biophysik 4, 97-100

JANNSEN, S., E.-R. LOCHMANN u. W. LASKOWSKI (1968)
DNS-Synthese nach Röntgenbestrahlung bei homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. Z.Naturforschg. 23b, 1500-1507

JANNSEN, S., E.-R. LOCHMANN u. R. MEGNET (1970)
Specific incorporation of exogenous thymidine monophosphate into DNA in Saccharomyces cerevisiae. FEBS-Letters 8, 113-115

KAPLAN, H.S., K.C. SMITH u. P. TOMLIN (1961)
Radiosensitization of E. coli by purine and pyrimidine analogues incorporated in deoxyribonucleic acid. Nature 190, 794-796

KAPLAN, H.S., K.C. SMITH u. P. TOMLIN (1962)
Effect of halogenated pyrimidines on radiosensitivity of E. coli. Radiation Res. 16, 98-113

KELNER, A. (1949)
Effect of visible light on the recovery of Streptomyces griseus conidia from UV-irradiation injury. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 35, 73-79

KILBEY, B.J. u. S.M. SMITH (1969)
Similarities between a UV-sensitive mutant of yeast and bacterial mutants lacking Excision-Repair ability. Molec.Gen.Genetics 104, 253-257

LAMPRECHT, I. (1969)
Mikrokalorimetrische Untersuchungen an Hefekulturen und Beiträge zur theoretischen Deutung. Diss.Math.-Naturw.Fak.Freie Universität Berlin

LANIER, W.B., R.W. TUVESON u. J.E. LENNOX (1968)
A radiation sensitive mutant of Aspergillus nidulans. Mutation Res. 5, 23-31

LASKOWSKI, W. (1960)
Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. I. Aufbau homozygoter Stämme und Dosiseffektkurven für ionisierende Strahlen, UV und organische Peroxyde. Z.Naturforschg. 15b, 495-506

LASKOWSKI, W. (1962)
VI. Über den Aufbau weitgehend isogener, homozygoter penta- und hexaploider Stämme sowie den Einfluß bestimmter mutierter Allele auf die Strahlenresistenz. Z.Naturforschg. 17b, 93-108

LASKOWSKI, W., E.-R. LOCHMANN, S. JANNSEN u. E. FINK (1968)
Zur Isolierung einer strahlensensiblen Saccharomyces-Mutante, Empfindlichkeit des Koloniebildungsvermögens, der RNS- und Proteinsynthese. Biophysik 4, 233-242

LASKOWSKI, W. u. D. AVERBECK (1968)
UV- and X-ray-sensitive mutants of Saccharomyces.
studia biophysica 12, 167-172

LATARJET, R. u. B. EPHRUSSI (1949)
Courbes de survie de levures haploides et diploides soumises aux rayons.
C.R. hebd.Seances Acad.Sci. 229, 306-308

LAWLEY, P.D. u. P. BROOKES (1965)
Molecular mechanism of the cytotoxic action of difunctional alkylating agents and of resistance to this action.
Nature 206, 480-483

LEDERBERG, J. u. E. (1952)
Replica plating and indirect selection of Bacterial mutants.
J.Bacteriol. 63, 399-406

LENNOX, J.E. u. R.W. TUVESON (1967)
The isolation of ultraviolet sensitive mutants from Aspergillus rugulosus.
Radiation Res. 31, 382-388

LINGENS, F. u. O. OLTMANNS (1966)
Über die mutagene Wirkung von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG) auf Saccharomyces cerevisiae.
Z.Naturforschg. 21b, 660-663

LINGENS, F., J. RAU u. R. SÜSSMUTH (1968)
Zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin bei der Mutationsauslösung: II. Produkte der Reaktion von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin mit Nucleobasen, Nucleosiden, Nucleosidphosphaten und Homopolyribonucleinsäuren.
Z.Naturforschg. 23b, 1565-1570

MATTERN, I.E., H. ZWENK u. A. RÖRSCH (1966)
The genetic constitution of the radiation sensitive mutant Escherichia coli B_{s-1}.
Mutation Res. 3,374-380

McCLARY, D.O., W.L. NULTHY u. G.R. MILLER (1959)
Effect of potassium versus sodium in the sporulation of Saccharomyces. J.Bacteriol. 78, 362-368

MORIMYO, M., Y. SHIMAZU u. K. SUZUKI (1969)
A mutant of Escherichia coli K 12 exhibiting varying ultraviolet sensitivities depending on the temperature of incubation after irradiation. II. Cross-sensitivity, recovery in liquid and genetic analysis. Mutation Res. 8, 467-479

MOUSTACCHI, E. (1969)
Cytoplasmic and nuclear genetic events induced by UV light in strains of Saccharomyces cerevisiae with different UV-sensitivities. Mutation Res. 7, 171-185

MOUSTACCHI, E., H. HOTTINGUER-de-MARGERIE u. F. FABRE (1967)
A novel character induced in yeast by P^{32} decay: the ability to manifest high frequencies of abnormal meiotic segregation. Genetics 57, 909-918

MUHAMMED, A. (1966)
Studies on the yeast photoreactivating enzyme. J.Biol.Chem. 241, 516-523

NAKAI, S. u. S. MATSUMOTO (1967)
Two types of radiation sensitive mutant in yeast. Mutation Res. 4, 129-136

NAGAI, S. (1969)
High frequency production of respiratory mutants in yeast under nutritional deficiencies. Mutation Res. 8, 557-564

NASIM, A. (1968) Repair-mechanisms and radiation-induced mutations in fission yeast. Genetics 59, 327-333

OGAWA, H., K. SHIMADA u. J.-I. TOMIZOWA (1968) Studies on radiation sensitive mutants of E. coli. I. Mutants defective in the repair synthesis. Molec.Gen.Genetics 101, 227-244

OLIVERA, B. u. J.R. LEHMANN (1967) Linkage of polynucleotides through phosphodiester bonds by an enzyme from Escherichia coli. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57, 1426-1433

PARRY, J.M. u. E.M. PARRY (1969) The effects of UV-light post-treatments on the survival characteristics of 21 UV-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae. Mutation Res. 8, 545-556

PATRICK, M.H., R.H. HAYNES u. R.B. URETZ (1964) Dark recovery phenomena in yeast I. Comparative effects with various inactivating agents. Radiation Res. 21, 144-163

PATRICK, M.H. u. R.H. HAYNES (1964) Dark recovery phenomena II. Conditions that modify the recovery process. Radiation Res. 23, 564-579

PETTIJOHN, D. u. P. HANAWALT (1964) Evidence for repair replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. J.Mol.Biol. 9, 395-410

PUGLISI, P.P. (1967) Genetic control of radiation sensitivity in yeast. Radiation Res. 31, 856-866

van de PUTTE, P. u. C.A. van SLUIS (1965) — The location of genes controlling radiation sensitivity in Escherichia coli. Mutation Res. 2, 97-110

van de PUTTE, P., H. ZWENK u. A. RÖRSCH (1966) — Properties of four mutants of Escherichia coli defective in genetic recom bination. Mutation Res. 3, 381-392

RESNICK, M.A. (1968) — Genetic control of lethality and mutation in Saccharomyces cerevisiae. Ph.D.THESIS, U.S. Atomic Energy Comm.Doc.UCLRL-18404

RESNICK, M.A. (1969a) — Genetic control of radiation sensitivity in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 62, 519-531

RESNICK, M.A. (1969b) — Induction of mutations in Saccharomyces cerevisiae by ultraviolet light. Mutation Res. 7, 315-332

RESNICK, M.A. (1969c) — A photoreactivationless mutant of Saccharomyces cerevisiae. Photochem.Photobiol. 9, 307-312

RODARTE, U., S. FOGEL u. R.K. MORTIMER (1968) — Detection of recombination defective mutants in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 60, 216-217

RUPERT, C.S. (1962a) — Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA I. Kinetics of the reaction. J.Gen.Physiol. 45, 703-724

RUPERT, C.S. (1962b) — Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA II. Formation of an enzyme-substrate complex. J.Gen.Physiol. 45, 725-741

RUPERT, C.S. (1965) — Relation of photoreactivation to photoenzymatic repair in Escherichia coli. Photochem.Photobiol. 4, 271-275

RUPERT, C.S., S.H. GOODGAL u. R.M. HERRIOTT (1958) — Photoreactivation in vitro of ultraviolet inactivated Hemophilus influenzae transforming factor. J.Gen.Physiol. 41, 451-471

RUPERT, C.S. u. W. HARM (1966) — Reactivation after photobiological damage. Advances in Radiation Biology 2, 1-81 Academic Press, New York

RUPP, W.D. u. P. HOWARD-FLANDERS (1968) — Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of Escherichia coli following ultraviolet irradiation. J.Mol.Biol. 31, 291-304

RUPP, W.D. u. P. HOWARD-FLANDERS (1969) — The reconstruction of chromosomal DNA following replication: a genetic recovery mechanism. Abstr. WPM-B 10, Biophys. J. 9

SCHAARSCHMIDT, B. (1970) — Eine einfache Methode zur Bestimmung des Quantenflusses von Bestrahlungslampen im Wellenlängenbereich 2400 Å - 6000 Å. Z.Naturforschg. 25b, 330-331

SCHÄDEL, H.-U. (1967) — Zur Strahlenresistenz von Saccharomyces-Stämmen; Einfluß von Genom und Umwelt auf die Röntgenstrahlenresistenz diploider Stämme. Diss.Math.-Naturw.Fak.Freie Universität Berlin

SCHROEDER, A.L. (1968) — A UV-sensitive mutant of Neurospora deficient for photoreactivation. Genetics 60, 223

SCHUSTER, H. (1969)
Die molekularen Grundlagen der Photoreaktivierung.
Curr.Topics Microbiol. 47, 40-68

SETLOW, R.B. u. J.K. SETLOW (1962)
Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 48, 1250-1257

SETLOW, R.B., P.A. SWENSON u. W.L. CARRIER (1963)
Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by UV-irradiation of cells.
Science 142, 1464-1466

SETLOW, R.B. u. W.L. CARRIER (1964)
The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 51, 226-231

SETLOW, R.B. u. W.L. CARRIER (1966)
Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA.
J.Mol.Biol. 17, 237-254

SETLOW, J.K. u. M.E. BOLING (1963)
The action spectrum of an in vitro DNA photoreactivation system.
Photochem.Photobiol. 2, 471-477

SETLOW, J.K. u. M.E. BOLING (1965)
The resistance of Micrococcus radiodurans to ultraviolet radiation
II. action spectra for killing,delay in DNA synthesis, and thymine dimerization.
Biochim.Biophys.Acta 108, 259-265

SETLOW, J.K. (1966a)
Photoreactivation.
Radiation Res.Suppl. 6, 141-155

SETLOW, J.K. (1966b)
The molecular basis of biological effects of UV-irradiation and photoreactivation.
In: M. Ebert u. A. Howard, Current Topics in Radiation Research, 2, 196-248, North Holland, Amsterdam

SETLOW, J.K. u. F.J. BOLLUM (1968) — The minimum size of the substrate for yeast photoreactivating enzyme. Biochim.Biophys.Acta 157, 233-237

SMITH, K.C. (1966) — Physical and chemical changes induced in nucleic acids by ultraviolet light. Radiation Res.Suppl. 6, 54-79

SMITH, K.C. u. A.K. GANESAN (1969) — Lack of post-replication repair in a recombination deficient derivative of Escherichia coli K 12. Abstr. WPM-B 11, Biophys. J. 9

SNOW, R. (1967) — Mutants of yeast sensitive to ultraviolet light. J.Bacteriol. 94, 571-575

SNOW, R. (1968) — Recombination in ultraviolet-sensitive strains of Saccharomyces cerevisiae. Mutation Res. 6, 409-418

SÜSSMUTH, R., P. CHANDRA, A. WACKER u. F. LINGENS (1969) — Zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG) bei der Mutationsauslösung III. Über die Hemmung der Nucleinsäuresynthese und zellfreien Proteinsynthese durch NNMG und über Resistenzerscheinungen von Escherichia coli-Zellen nach Behandlung mit NNMG. Z.Naturforschg. 24b, 707-712

SÜSSMUTH, R. u. F. LINGENS (1969) — IV. Beständigkeit des NNMG, Beziehungen zwischen Mutationsrate und Aufnahme des Mutagens durch die Zelle und Förderung der Methylierung durch Sulfhydrylgruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Z.Naturforschg. 24b, 903-910

SUTHERLAND, B.M., W.L. CARRIER u. R.B. SETLOW (1968)
Pyrimidine dimers in the DNA of Paramecium aurelia.
Biophys.J. 8 (N.Y.), 490-499

SWENSON, P.A. u. R.B. SETLOW (1966)
Effects of ultraviolet radiation on macromolecular synthesis in Escherichia coli.
J.Mol.Biol. 15, 201-219

SZYBALSKI, W. u. Z. LORKIEWICZ (1962)
On the nature of the principal target of lethal and mutagenic radiation effects.
Abhandl.Deut.Akad.Wiss. Berlin, Kl.Med. No.1, 63-71, in: Strahleninduzierte Mutagenese, Erwin-Baur-Gedächtnisvorles. II (H. Stubbe u. H. Böhme)

SZYBALSKI, W. (1967)
Molecular events resulting in radiation injury, repair and sensitization of DNA.
Radiation Res.Suppl. 7, 147-159

TAMAKI, H. (1965)
Chromosome behaviour at meiosis in Saccharomyces cerevisiae.
J.Gen.Microbiol. 41, 93-98

TUVESON, R.W. u. J.E. LENNOX (1968)
A UV-sensitive mutant of Aspergillus rugulosus unrelated to intergenic crossing over.
Canad.J.Genet.Cytol. 10, 50-53

UMLAUF, C., W. STEIN, I. PIETSCH u. E.-R. LOCHMANN (1970)
Über Dunkelreaktivierung nach UV- oder Röntgenbestrahlung bei Saccharomyces: Der Einfluß der Zellkonzentration und die Wirkung von Dimethylsulfoxid und von verschiedenen Farbstoffen auf die Dunkelreaktivierung.
Biophysik 6, 275-279

UNRAU, P. (1969)
The isolation of pyrimidine dimers in UV-sensitive strains of yeast. Lunteren Lectures on Molecular Biology Abstr. Section III, 3

WACKER, A., H. DELLWEG u. D. WEINBLUM (1960)
Strahlenchemische Veränderungen der Bakterien-Desoxyribonucleinsäure in vivo. Naturwissenschaften 47, 477-479

WEISS, B. u. C.C. RICHARDSON (1967)
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from Escherichia coli infected with T_4 bacteriophage. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57, 1021-1028

WINDISCH, S. u. W. LASKOWSKI (1960)
Die hefeartigen Pilze. In: "Die Hefen", Bd. 1, 23-208, Verlag Hans Carl, Nürnberg

WITKIN, E.M. (1966a)
Radiation-induced mutations and their repair. Science 152, 1345-1353

WITKIN, E.M. (1966b)
Mutation and the repair of radiation damage in bacteria. Radiation Res. Suppl. 6, 30-53

WITKIN, E.M. (1967)
Mutation-proof and mutation-prone modes of survival in derivatives of Escherichia coli B differing in sensitivity to ultraviolet light. Brookhaven Symp.Biol. 20, 17-55

WITKIN, E.M. (1969a)
Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Ann.Rev.Microbiol. 23, 487-514

WITKIN, E.M. (1969b) — The mutability toward ultraviolet light of recombination-deficient strains of Escherichia coli. Mutation Res. 8, 9-14

WULFF, D.L. u. C.S. RUPERT (1962) — Disappearance of thymine photodimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from baker's yeast. Biochem.Biophys.Res.Commun. 7, 237-240

ZAKHAROV, I.A., T.N. KOZINA u. I.V. FEDOROVA (1970) — Effets de mutations vers la sensibilite au rayonnement ultraviolet chez la levure. Mutation Res. 9, 31-39

ZIMMERMANN, F.K. (1968a) — Sensitivity to methylmethansulfonate and nitrous acid of ultraviolet light-sensitive mutants in Saccharomyces cerevisiae. Molec.Gen.Genetics 102, 247-256

ZIMMERMANN, F.K. (1968b) — The effect of liquid holding on chemical induced lethality and mitotic gene conversion in Saccharomyces cerevisiae. Molec.Gen.Genetics 103, 11-20

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit vom Sommersemester 1967 bis zum Sommersemester 1970 am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Laskowski bin ich für das Thema, für ständige Betreuung und Förderung der Arbeit, für zahlreiche Anregungen sowie für vielfältig gewährte Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet.

Viele Mitglieder des Institutes haben durch anregende Diskussionen und Hinweise den Fortgang der Experimente wesentlich gefördert. Insbesondere möchte ich herzlichen Dank sagen Fräulein F. Eckardt, Frau Dr. S. Jannsen und den Herren Dr. I. Lamprecht, Prof. Dr. E.-R. Lochmann, Dr. U. Reichert, Dipl. Phys. B. Schaarschmidt und Dr. M. Shahin.

Frau M. Siewert und Herrn Bjeske danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft.

Frau E. Lehmann-Brauns bin ich dankbar für die hilfreiche technische Assistenz.

LEBENSLAUF

Am 8. November 1942 wurde ich als Sohn des Fachschulrates Friedrich Averbeck und seiner Frau Hertha, geb. Fleischmann, in Stettin geboren.

Nach der Flucht im Frühjahr 1945 siedelten wir nach Hemeringen/Niedersachsen um. Ab Ostern 1949 besuchte ich dort die Grundschule.

Nach einem Wohnungswechsel nach Neustadt a/Rbge. bestand ich Ostern 1953 die Aufnahmeprüfung zur Mittelschule.

Im Herbst 1954 zogen wir nach Walsrode/Niedersachsen. Ostern 1956 wurde ich in das Gymnasium Walsrode aufgenommen, an dem ich im April 1962 das Abitur ablegte.

Zum Sommersemester 1962 wurde ich an der Freien Universität Berlin für die Fachrichtung Zoologie immatrikuliert. Im Sommersemester 1966 bestand ich dort die Diplom-Vorprüfung.

Das Thema der vorliegenden Arbeit erhielt ich im Sommersemester 1967 von Herrn Prof. Dr. W. Laskowski. Seit Mai 1968 bin ich als Wissenschaftlicher Hilfsassistent am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin angestellt.